



TITLE:

# mTOR 阻害薬の適正使用を目指した薬物動態とその変動因子に関する研究( Dissertation\_全文 )

AUTHOR(S):

佐藤, 栄里子

---

CITATION:

佐藤, 栄里子. mTOR 阻害薬の適正使用を目指した薬物動態とその変動因子に関する研究. 京都大学, 2014, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2014-09-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r12856>

RIGHT:

mTOR 阻害薬の適正使用を目指した薬物動態と  
その変動因子に関する研究

2 0 1 4

佐 藤 栄 里 子



# 目 次

## 総 論 の 部

緒 言	1
-----	---

## 第 I 章 膵島移植患者における mTOR 阻害薬の薬物動態特性

第 1 節 シロリムスの薬物動態解析	4
第 2 節 シロリムスとエベロリムスの薬物動態の比較	10
考 察	14

## 第 II 章 エベロリムスの薬物間相互作用発現機構

第 1 節 薬物動態における小腸及び肝臓初回通過効果の寄与	18
第 2 節 イトラコナゾールとの相互作用における投与経路の影響	23
考 察	27

## 第 III 章 肝移植後の慢性拒絶に対する mTOR 阻害薬の有用性と薬物動態

考 察	37
-----	----

## 結 論

## 謝 辞

## 実 験 の 部

第 I 章 実験の部	44
第 II 章 実験の部	46
第 III 章 実験の部	49

## 論 文 目 録

## 引 用 文 献



# 総 論 の 部

## 緒 言

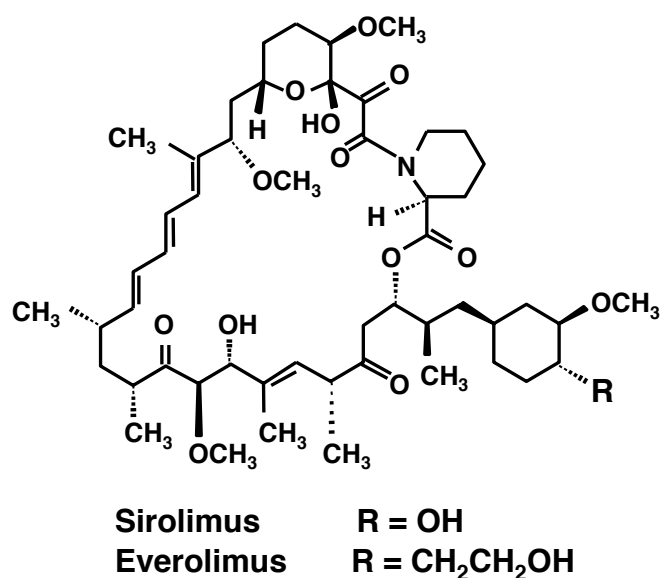
移植医療は、末期臓器不全患者に対する最後の治療として定着しつつある。その中で膵島移植は、インスリン分泌が枯渇した糖尿病患者に対する $\beta$ 細胞補充療法の一つである<sup>1)</sup>。膵島移植とは、提供された膵臓からインスリンを分泌する $\beta$ 細胞を含む膵島組織を分離し、局所麻酔下で経皮的に門脈内に注入する治療方法である。臓器そのものを移植する膵臓移植と比較して、開腹手術の必要がなく低侵襲であること、外分泌組織は除かれているために膵液漏出など激的な副作用がないこと等が利点として挙げられる。一方、細胞移植治療であることから生検を用いた組織学的な診断ができないため、免疫抑制療法が非常に重要となる。膵島移植治療においては2000年に、高用量の mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害薬シロリムスと低用量のカルシニューリン阻害薬タクロリムスを併用するエドモントンプロトコル<sup>2)</sup>が採用されてから、治療成績が飛躍的に向上した。京都大学医学部附属病院(京大病院)では2004年4月、本邦1例目の膵島移植を行った<sup>3)</sup>。しかし当時は、膵島移植後の免疫抑制薬の薬物体内動態に関するデータはほとんどない状態であった。一方肝移植は、末期肝不全患者に対する治療の最終手段と位置づけられ、本邦では健常者の部分肝を移植する生体肝移植が大部分を占める。この肝移植においては、タクロリムスや同機序のシクロスポリンによる免疫抑制療法が、移植後の患者生存率の向上に大きく寄与してきた。しかし、治療に難渋する拒絶反応が発生することもあり、さらなる免疫抑制療法のプロトコル開発が望まれている。

シロリムスは、1975年にイースター島の Rapa-Nui で採取された放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* が産生するマクロライド系抗生物質として発見された。その作用機序として、細胞質内のイムノフィリンである FK506 結合タンパク質 (FKBP12) と複合体を形成し、その複合体が mTOR の機能を阻害する<sup>4)</sup>。mTOR は分子量約 290kDa の蛋白リン酸化酵素であり、その下流エフェクターである p70

S6 kinase、mRNA 翻訳開始因子 eIF4Eなどを介して細胞の成長を制御している。シロリムスによって mTOR 活性が阻害されると、細胞周期が G1 期で停止する。シロリムスは今日まで国内未承認であるため、日本人における体内動態に関するデータは皆無であった。他方、シロリムスの誘導体であるエベロリムスは、2007 年には免疫抑制薬サーティカン®として、2010 年には抗悪性腫瘍薬アフィニートール®として製造承認を取得しており、使用が拡大しつつある。

mTOR 阻害薬はシクロスポリンとの併用下で免疫抑制薬として臨床開発が行われており、タクロリムス併用下での薬物動態に関する情報は少ない。また、これらの薬物は、いずれも薬物代謝酵素チトクローム P450 (CYP) 3A4 及び薬物排出トランスポータ P 糖蛋白質 (Pgp) の基質であり<sup>5-7)</sup>、体内動態の相互作用が推察されるが詳細は不明である。

以上の背景を踏まえ著者は、日本人における mTOR 阻害薬の体内動態解析を目的とし、以下の検討を行った。すなわち、第 I 章では腓島移植患者における mTOR 阻害薬の体内動態について検討した。第 II 章では、mTOR 阻害薬の体内動態における小腸・肝臓の寄与及び併用薬の影響を研究した。第 III 章では、肝移植後慢性拒絶症例における mTOR 阻害薬体内動態について検討した。



**Fig. Chemical structures of mTOR inhibitors.**

## 第I章 膵島移植患者における mTOR 阻害薬の薬物動態特性

膵島移植は、インスリン分泌が枯渇した糖尿病患者に対する $\beta$ 細胞補充療法の一つである<sup>1)</sup>。膵島移植後の免疫抑制療法は、高用量のシロリムスと低用量のタクロリムスを併用するエドモントンプロトコル<sup>2)</sup>を基本としている。

シロリムスは、mTOR 阻害を介してリンパ球の活性化を抑制する<sup>4)</sup>。本邦では免疫抑制薬として未承認であるが、海外では腎移植や肝移植等に用いられ、優れた効果が認められている。シロリムス血中濃度を至適範囲に保つことは、拒絶反応の抑制に重要なだけでなく、血中濃度上昇に伴って発生頻度が高くなる血球減少や脂質異常症等の副作用回避に重要である<sup>8)</sup>。そのため、血中濃度モニタリングが推奨されている。膵島移植治療においては、シロリムスは主要な免疫抑制薬としてエビデンスが蓄積している。一方、シロリムス誘導体であるエベロリムスは、経口吸収率の上昇、消失半減期の短縮など体内動態がシロリムスに比べて改善しているが<sup>9)</sup>、膵島移植におけるエビデンスは乏しい。また、mTOR 阻害薬や併用されるカルシニューリン阻害薬は、いずれも薬物代謝酵素 CYP3A や薬物排出トランスポーター Pgp の基質として知られており、小腸、肝臓等において薬物動態学的相互作用が生じ得る。

膵島移植後の免疫抑制療法はエドモントンプロトコルに準じ、シロリムスとタクロリムスを用いるのが標準である。しかし本邦では、シロリムスは免疫抑制薬として未承認であり、個人輸入にて入手するしかない。一方、シロリムス誘導体であるエベロリムスは、本邦においても免疫抑制薬として承認されている(2004 年の研究当時は承認申請中)。そこで著者らは、膵島移植患者 2 名においてシロリムスからエベロリムスへの切り替えを試みた。

本章では、mTOR 阻害薬の体内動態変動因子を明らかにするため、第 1 節では膵島移植患者 6 名におけるシロリムス体内動態の速度論的解析を試みるとともに、血中濃度と副作用との関連について検討した。第 2 節では 2 つの mTOR 阻害薬、シロリムスとエベロリムスの薬物動態の比較を行った。



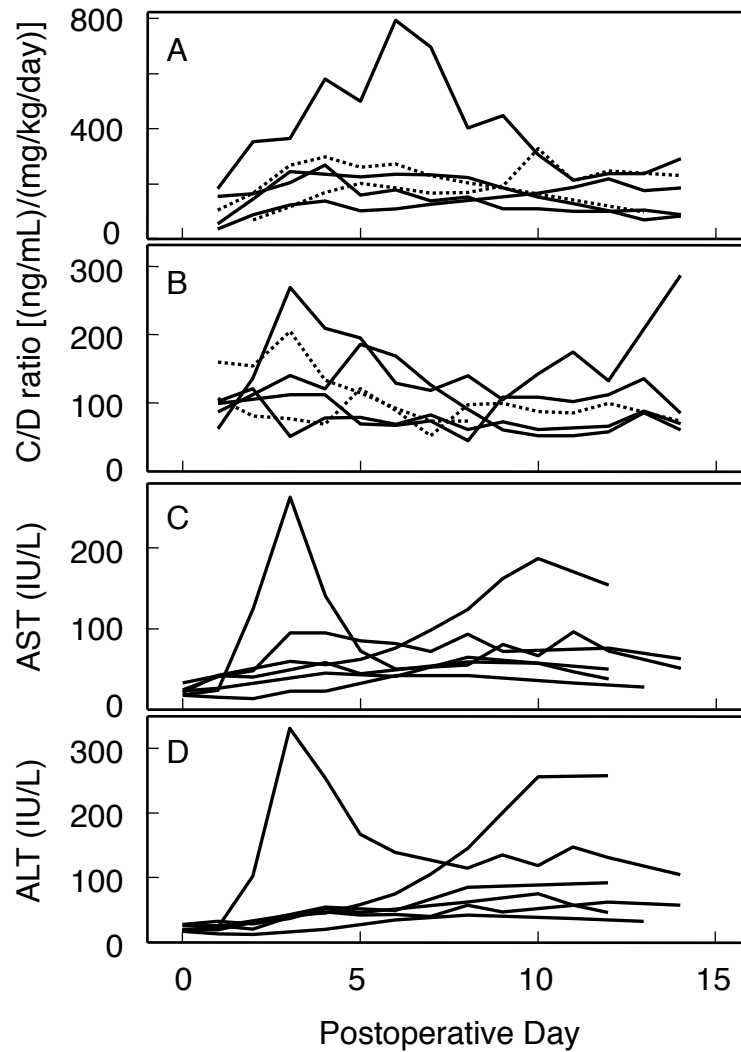
## 第 1 節 シロリムスの薬物動態解析

膵島移植後の免疫抑制療法としてタクロリムスと併用投与されたシクロリムスの薬物動態について研究を行った。なお、本研究における膵島移植は、心停止ドナーからの膵臓を用いて行なわれた。膵島移植後の免疫抑制療法はエドモントンプロトコルに従い、シロリムスの負荷投与（移植当日：0.2 mg/kg、翌日：0.1 mg/kg）を行った<sup>10)</sup>。Fig. I-1A 及び B に、個々の患者における膵島移植後のシロリムス(A)、タクロリムス(B)の血中濃度／投与量比(C/D 比)を示す。投与量を体重で補正しているにも関わらず、C/D 比に著しい個体間及び個体内変動を認めた。この結果に *CYP3A5\*1* あるいは\*3 遺伝子多型の影響は認められなかった。Table I-1 に示す通り、全ての患者で移植前の肝機能値は正常であったが、移植後 2 週間の間でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) の一過性の上昇を示す患者が認められた (Fig. I-1C & D)。

**Table I-1. Demographics and clinical data before the transplantation in pancreatic islet transplant recipients.**

Age (year)	39 (35-58) <sup>a</sup>
Male/Female	2/4
Weight (kg)	57 (37-70) <sup>a</sup>
Aspartate aminotransferase (U/L)	20 (15-32) <sup>a</sup>
Alanine aminotransferase (U/L)	18 (16-26) <sup>a</sup>
Serum creatinine (mg/dL)	0.75 (0.4-2.1) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Values are presented as the median (range).



**Fig. I-1. Individual trough concentration per dose (C/D) ratios of sirolimus and tacrolimus, and results of liver function tests.** Profiles of C/D ratios of sirolimus (A) and tacrolimus (B), and aspartate aminotransferase (AST) (C) and alanine aminotransferase (ALT) values (D) for two weeks immediately after pancreatic islet transplantation are plotted. In panels A and B, dotted and solid lines show carriers of the *CYP3A5*\*1/\*3 and \*3/\*3 genotype, respectively.

移植直後 2 週間を対象に、シロリムス体内動態の速度論的解析を試みた。シロリムスのクリアランスが一定であると仮定したモデルと、移植後 X 日まで CL が徐々に大きくなり以降一定としたモデルを設定し、前者を Basic-model、後者を POD-model (POD, postoperative days) と名付けた。

$$\text{Basic-model: CL/F} = \theta_1 * \text{WT}$$

$$\text{V/F} = \theta_2 * \text{WT}$$

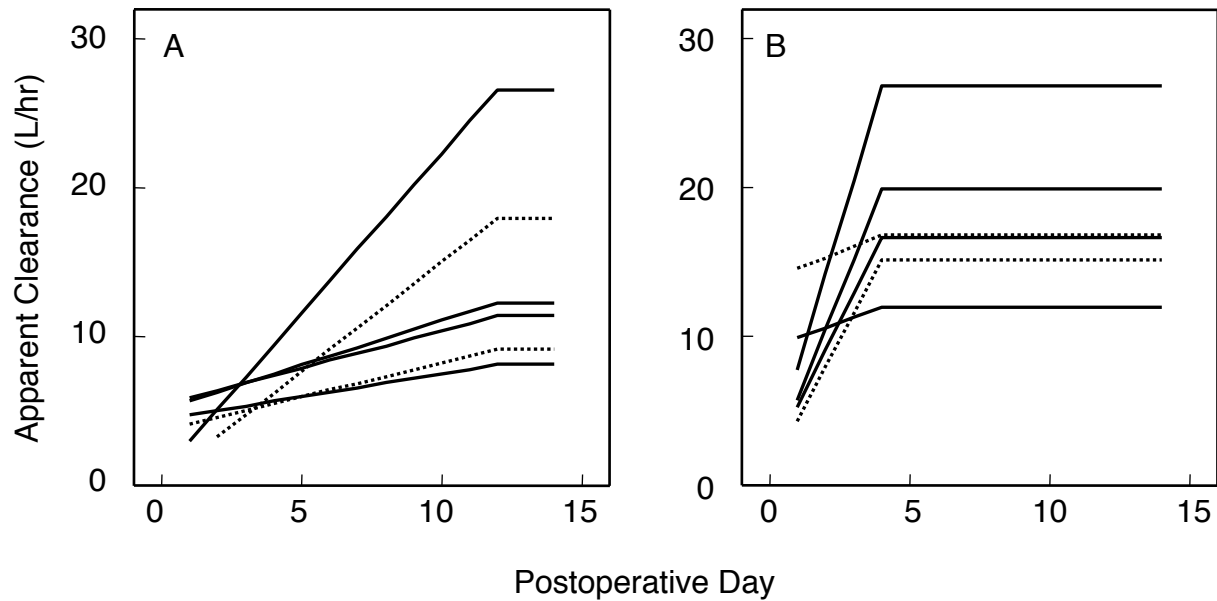
$$\text{POD-model: CL/F} = (\theta_1 + \theta_3 * \text{POD/X}) * \text{WT} \quad (\text{POD} \leq \text{X})$$

$$\text{CL/F} = (\theta_1 + \theta_3) * \text{WT} \quad (\text{POD} > \text{X})$$

$$\text{V/F} = \theta_2 * \text{WT}$$

Basic-model と比較して、POD-model の予測値が実測値と良く一致し、X=12 とした時にモデルの適合性を示す objective function の値が最小となった。推定された見かけのクリアランスの変動を Fig. I-2A に示す。Fig. I-3 は、各症例の血中濃度推移を Basic-model 及び POD-model に当てはめてシミュレーションした結果であり、POD-model の予測値と実測値が良く一致することを示す。同様の検討をタクロリムスでも行った結果、POD-model で X=4 とした時に objective function の値が最小となり (Fig. I-2B)、Basic-model に比べて実測値と良く一致した。Table I-2 に、POD-model におけるシロリムス及びタクロリムスの速度論的パラメータを示す。シロリムス、タクロリムスとも著しい個体間変動が認められた。

Fig. I-4 には、シロリムス及びタクロリムスのトラフ血中濃度と白血球数の推移を示す。症例 5 と 6 において、移植後 10 日目には白血球数が 30% 以上減少した。この 2 名では G-CSF 製剤の投与を必要とし、移植後 5 日間のシロリムス血中濃度が高い傾向が認められた (27.2 vs 18.0 ± 7.2 ng/mL)。ただし、移植前の臨床検査値及び CYP3A5\*1,\*3 遺伝子多型はともに、シロリムス血中濃度上昇との関連性を認めなかった。他の有害事象として 1 名の患者で血小板減少が認められたが、移植後 1 ヶ月以内でのコレステロール値上昇は認められなかった。また、急性拒絶を示した患者はいなかった。



**Fig. I-2. The increase in the clearance of sirolimus and tacrolimus according to the postoperative day.** In panel A, the clearance of sirolimus increases linearly up to postoperative day 12, and is fixed after that. In panel B, the clearance of tacrolimus increases linearly up to postoperative day 4, and is fixed after that. Dotted and solid lines show carriers of the *CYP3A5*\*1/\*3 and \*3/\*3 genotype, respectively.

**Table I-2. Pharmacokinetic parameters of sirolimus and tacrolimus in pancreatic islet transplant recipients.**

	Sirolimus	Tacrolimus
$\theta_1$	$0.0776 \pm 0.0620$	$0.0803 \pm 0.0953$
$\theta_3$	$0.167 \pm 0.131$	$0.241 \pm 0.160$
CL/F (L/hr)	$14.1 \pm 7.1^a$	$17.0 \pm 5.1^b$
V/F (L)	$790 \pm 659$	$469 \pm 393$
$T_{1/2}$ (hr)	$37.3 \pm 27.9^a$	$17.1 \pm 14.4^b$

Values represent the mean  $\pm$  SD for 6 patients.

If  $POD \leq X$ ,  $CL/F = (\theta_1 + \theta_3 * POD/X) * WT$ , otherwise  $CL/F = (\theta_1 + \theta_3) * WT^c$ .

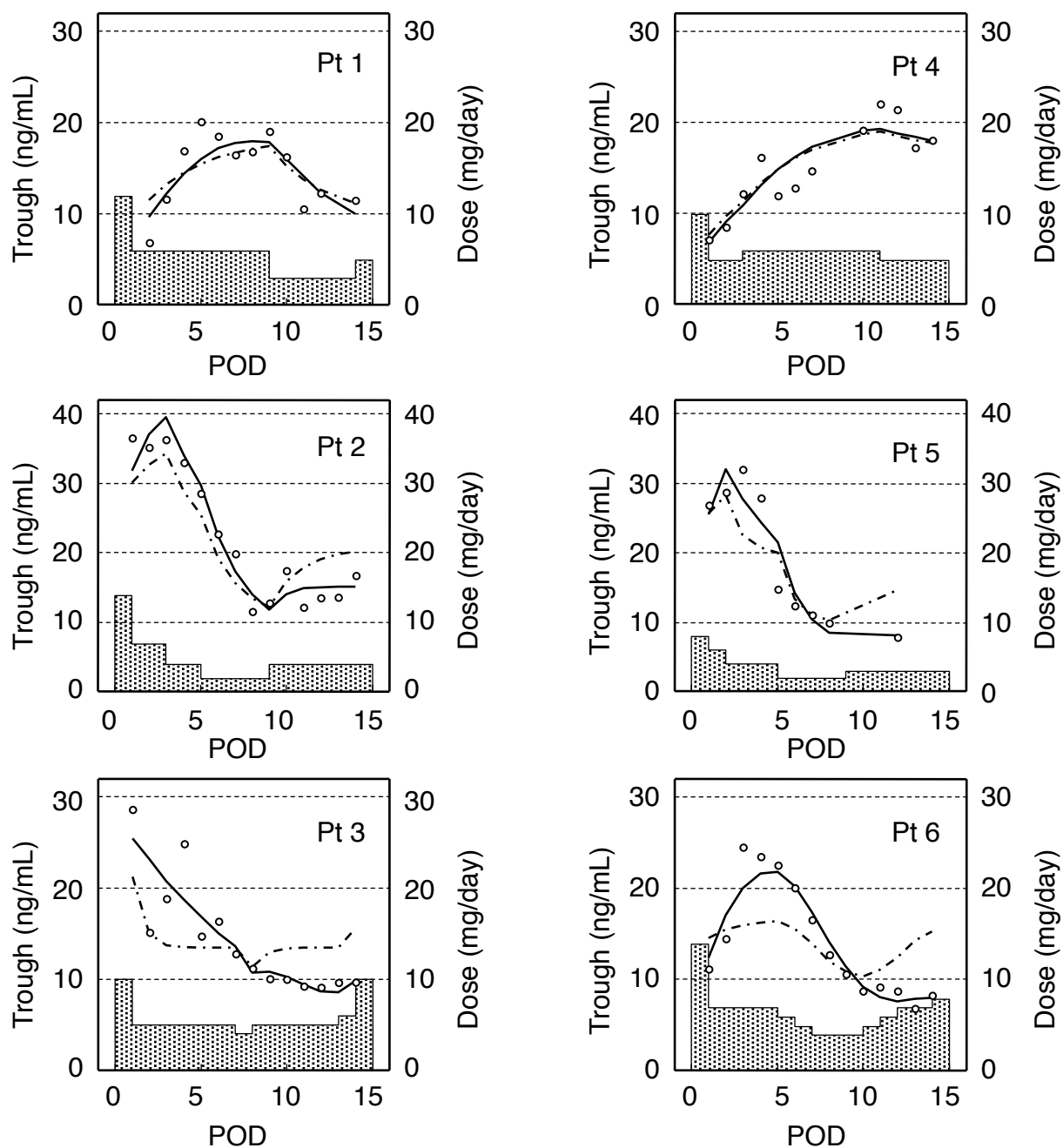
CL, total body clearance; V, volume of distribution; F, oral bioavailability;

$T_{1/2}$ , half-life; POD, postoperative day

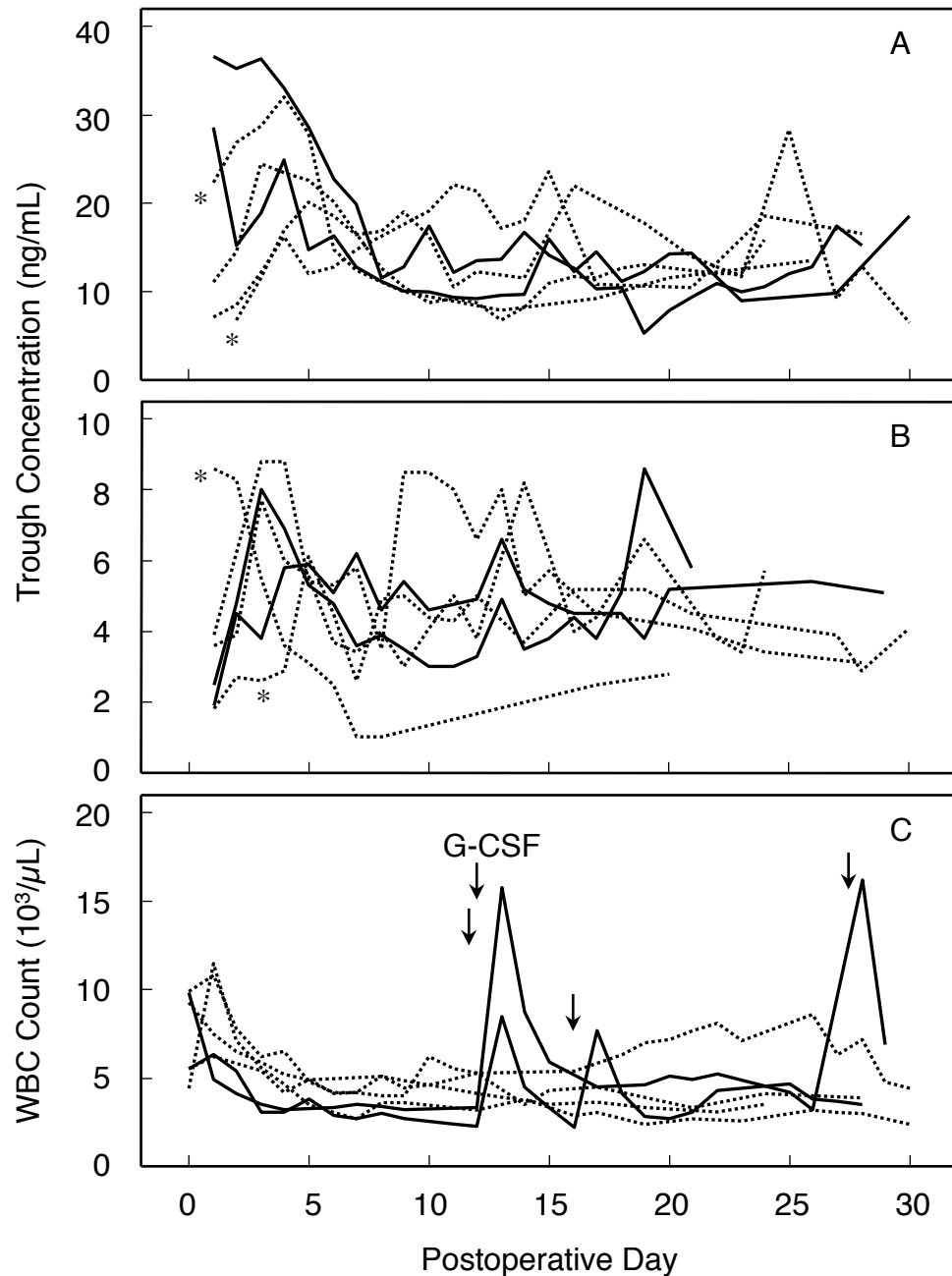
<sup>a</sup> Constant value 12 days after transplantation

<sup>b</sup> Constant value 4 days after transplantation

<sup>c</sup> X is 12 for sirolimus, 4 for tacrolimus.



**Fig. I-3. Pharmacokinetic analysis of sirolimus in each patient applying the Basic-model or POD-model.** Open circles show measured blood trough concentrations of sirolimus, and the dotted area shows daily dosages. Chain and solid lines are simulation curves applied to the Basic-model and POD-model, respectively. POD, postoperative day.

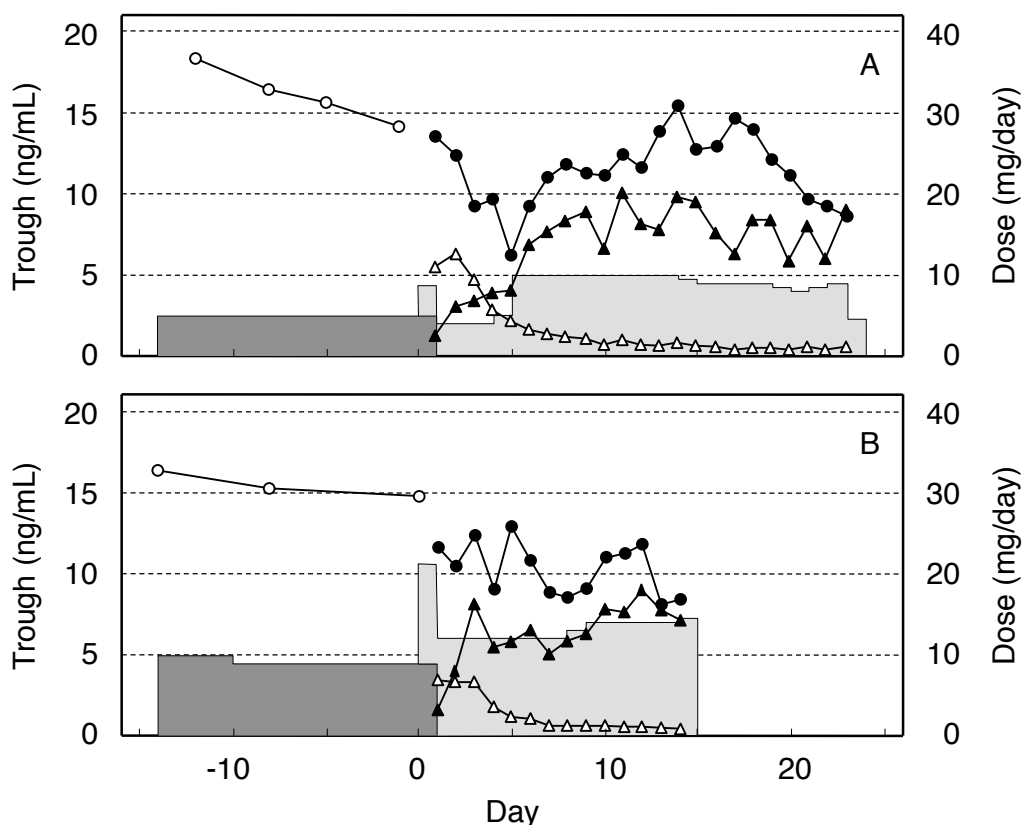


**Fig. I-4. Individual trough concentration profiles of sirolimus and tacrolimus, and change of white blood cell (WBC) counts in six patients transplanted with the pancreatic islet.** Trough concentration profiles of sirolimus (A) and tacrolimus (B), and WBC counts (C) for 30 days after the transplantation are plotted. Solid and dotted lines show patients with or without administration of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), respectively. In panels A and B, lines with asterisks indicate carriers of the *CYP3A5*\*1/\*3 genotype.

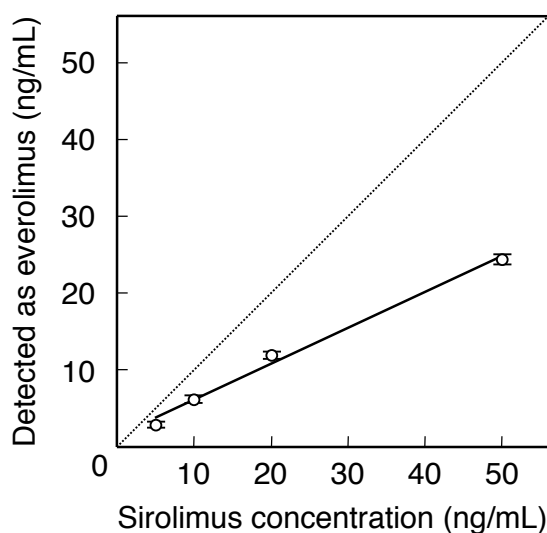
## 第 2 節 シロリムスとエベロリムスの薬物動態の比較

免疫抑制療法において、シクロリムスからエベロリムスに切り替えた 2 症例について両薬物の体内動態の比較を行った。症例 1 は 48 歳の女性で、臍島移植後はエドモントンプログラムに準じてシロリムス (5 mg/day) とタクロリムス (3 mg/day) にて治療されていた。移植後 36 日目に、シロリムスからエベロリムスへと mTOR 阻害薬の切り替えを行った。本節では切り替え日を Day 0 とする。Day 0 にはシロリムスとエベロリムス両方を投与し、以降はエベロリムスのみの投与とした。シロリムスは 1 日 1 回、エベロリムスは 1 日 2 回投与とした。切り替え前のシロリムス血中濃度は HPLC/UV 法にて測定し、トラフ血中濃度を 12-15 ng/mL に維持した。Day 0 以降、エベロリムス血中濃度は fluorescence polarization immunoassay (FPIA) 法にて測定し、12-15 ng/mL になるよう投与量を調節した。切り替え時における投与量に関する情報がなかったため、Day 0 におけるエベロリムスの投与量はシロリムスのそれより少ない 4 mg/day として開始した。しかし、エベロリムス血中濃度が徐々に低下したため投与量を漸増した結果、10 mg/day で目標血中濃度を維持できた (Fig. I-5A)。症例 2 は 41 歳の女性で、移植後 63 日目にエベロリムスの投与を開始した。症例 1 での経験を踏まえ、シロリムス維持投与量 (9 mg/day) より多い 12 mg/day でエベロリムス投与を開始した。その結果、切り替え後のエベロリムス血中濃度の落ち込みは生じなかった (Fig. I-5B)。なお、症例 1 及び 2 の何れにおいても、切り替え前後でタクロリムス血中濃度は 3-6 ng/mL の範囲で維持されていた。研究期間中、有害反応は認めなかった。

Day 0 以降のシロリムス、エベロリムス血中濃度を HPLC/mass spectrometry (LC/MS) 法にて測定した (Fig. I-5)。シロリムスは、投与を中止した後も数日間、血中に残存しており、消失が遅延することが確認された。FPIA 法によるエベロリムス血中濃度は、特に切り換え直後において LC/MS 法による測定値より大きかった。エベロリムスの FPIA 法に用いる抗体が、シロリムスに対して交叉反応を示すためと考えられた。そこで、エベロリムスの FPIA 法を用いて全血にスパイクしたシロリムス濃度を測定したところ、交叉反応性を示し、相関係数は、 $[\text{Detected as everolimus}] = 1.43 + 0.47 \times [\text{Sirolimus concentration}]$  ( $r^2 = 0.992$ ) と算出された (Fig. I-6)。



**Fig. I-5. Individual trough concentration profiles of sirolimus and everolimus.** Trough blood concentrations of sirolimus measured by HPLC/UV (open circles) and LC/MS (open triangles), and those of everolimus measured by FPIA (closed circles) and LC/MS (closed triangles) were plotted for Patient 1 (A) and 2 (B). Dark and light shaded areas show daily dosages of sirolimus and everolimus, respectively.

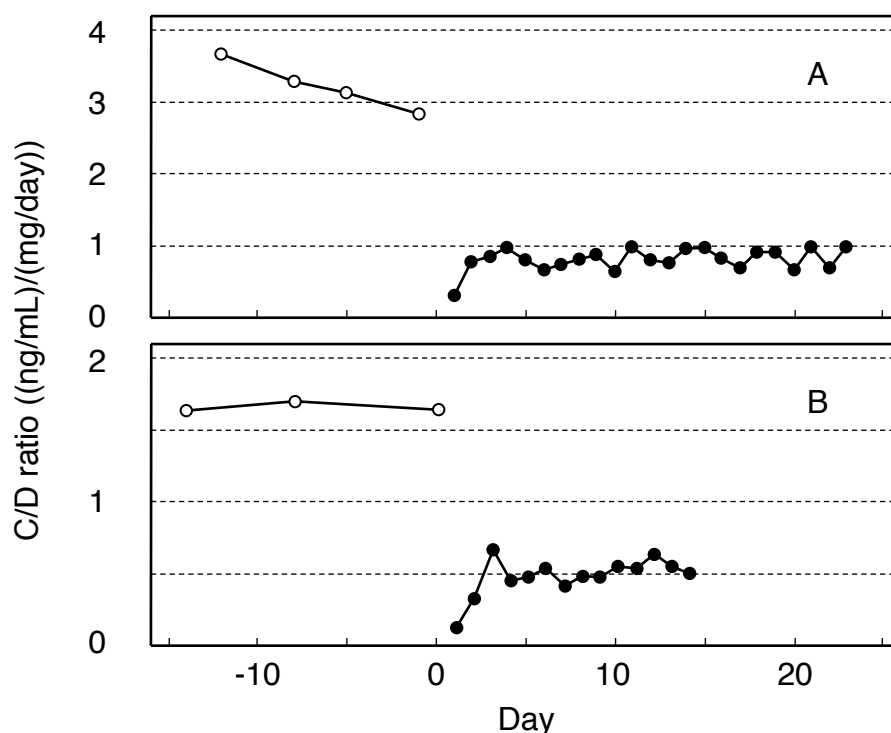


**Fig. I-6. Sirolimus blood concentrations measured by the FPIA method for everolimus.** Each point represents the mean  $\pm$  SD (n = 3). The solid line shows the fitting line. The dotted line represents the line of identity (i.e., slope = 1).

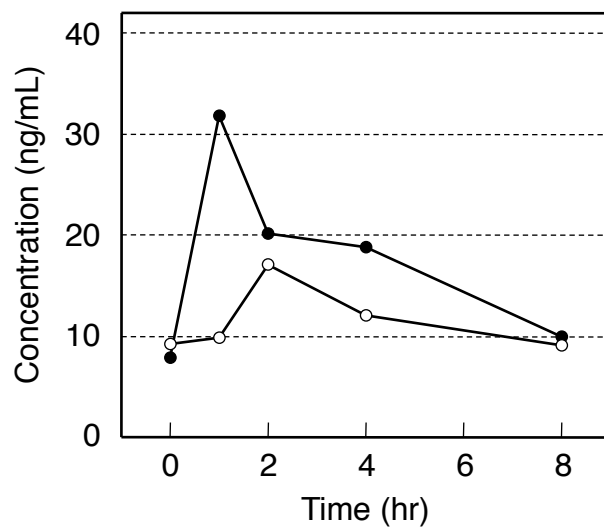


Fig. I-7 にはシロリムスとエベロリムスの血中濃度／投与量比 (C/D 比)を示す。エベロリムスの C/D 比は LC/MS 法にて測定した結果より求めた。症例 1 のシロリムス及びエベロリムスの C/D 比はそれぞれ  $3.26 \pm 0.35$  (ng/mL)/(mg/day) (mean  $\pm$  SD,  $n = 4$ )及び  $0.87 \pm 0.12$  ( $n = 22$ , day 1 を除く)であった。症例 2 ではそれぞれ  $1.67 \pm 0.03$  ( $n = 3$ )、 $0.52 \pm 0.09$  ( $n = 13$ , day 1 を除く)であった。症例 1 及び 2 ともに、エベロリムスの C/D 比はシロリムスの約 1/3 であった。また、シロリムスとエベロリムスの何れにおいても、症例 1 の C/D 比は症例 2 の約 2 倍であった。

症例 1 は day 23、症例 2 は day13 において、同一日内で経時的採血を行い、LC/MS 法にてエベロリムスの血中濃度を測定した (Fig. I-8)。症例 1 はエベロリムスの投与量が 4.5 mg であり、2 時間後に最高血中濃度 17.1 ng/mL を示した。症例 2 では、最高血中濃度はエベロリムス (7 mg) 投与 1 時間後に観察され、31.8 ng/mL を示した。台形法にて算出した  $AUC_{0-8h}$  は、症例 1 では 94 ng·hr/mL、症例 2 では 142 ng·hr/mL であった。症例 1 及び 2 において、トラフ血中濃度はいずれも約 10ng/mL と同程度であったが、最高血中濃度は約 2 倍異なることが観察された。



**Fig. I-7. The trough concentration per dose (C/D) ratios of sirolimus (open circles) and everolimus (closed circles) were plotted for Patient 1 (A) and 2 (B).**



**Fig. I-8. Everolimus blood concentration profiles after oral administration in the two patients.** Open and closed circles show everolimus concentration of patient 1 and patient 2, respectively.

## 考察

エドモントンプロトコルの導入により、膵島移植の治療成績は大きく向上した<sup>11)</sup>。著者らの検討でも、全ての患者において、血糖値の安定化、血中 C-ペプチドの検出、HbA1c の正常化など、病態が改善した。

膵島移植患者におけるシロリムスとタクロリムスの C/D 比には、著しい個体間及び個体内変動が認められた。膵島移植では、調製した膵島を門脈内へ注入するため、移植直後の肝機能は一時的に悪化すると考えられる。実際、肝機能検査値の変動が認められ、この現象は既報とも一致する<sup>12)</sup>。肝機能の一時的増悪の原因として、門脈は静脈系ではあるが、注入された膵島が門脈微細血管を閉塞することにより低酸素障害を与えた可能性が考えられる。また、炎症性サイトカインの誘導が、肝機能悪化に影響するとの説もある<sup>13)</sup>。何れにしても肝機能の一時的増悪によって、肝代謝型薬物であるシロリムス及びタクロリムスのクリアランスは、膵島移植直後は小さく、肝機能の回復につれて大きくなることを示すものと考えられた。解析の結果、肝機能検査値とシロリムスの見かけのクリアランスの間に直接的な相関関係は認められなかったが、POD-model による推定値が実測値とよく一致していた (Fig. I-3)。従って、シロリムス体内動態の個体内変動は、主に術後経過日数によって規定されうることが示唆された。

本研究では、膵島移植 12 日以降のシロリムスの見かけのクリアランスは、平均 14.0 L/hr と算出された。これは、シロリムスとシクロスポリンを併用する海外腎移植症例における報告<sup>14, 15)</sup>と比較して、1.5 倍程度大きな値であった。この原因は、併用するカルシニューリン阻害薬がタクロリムスとシクロスポリンで異なるためであると推測される。シロリムス、タクロリムス及びシクロスポリンはいずれも CYP3A4 の基質であり<sup>5, 7, 16)</sup>、タクロリムスとシクロスポリンはともにシロリムスの体内動態に影響する可能性はある。しかし、シクロスポリンがシロリムス血中濃度を上昇させるという報告はあるが<sup>17-19)</sup>、タクロリムスでの報告は認めない。最近、シロリムスとタクロリムスの併用投与を行った健常人における試験にて、タクロリムスはシロリムスの血中濃度を上昇させないことが示された<sup>20)</sup>。これは、シロリムス代謝に対するシクロスポリンとタクロリムスの阻害強度は同程度であるが<sup>21)</sup>、臨床血中濃度がシクロスポリンで 10 倍程度高値で

あることに起因すると考えられる。

生体からの膵島移植は事前に決定したスケジュールに則って行われるため、移植前から免疫抑制薬投与を開始することが可能である<sup>22)</sup>。一方、脳死ドナーからの膵島移植は予定を立てることが出来ないため、免疫抑制薬の負荷投与が必要となる。本研究で示した心停止移植後のシロリムス血中濃度推移の結果は、エドモントンプロトコルにおける移植直後におけるシロリムスの負荷投与（移植当日：0.2 mg/kg、翌日：0.1 mg/kg）を行うと、日本人では血中濃度が目標値を大きく上回る可能性が高いことを示す。シロリムスの重大な有害反応の一つに白血球減少症があり、シロリムスのトラフ血中濃度が 15<sup>23)</sup>あるいは 12 ng/mL<sup>24)</sup>を超えると白血球数が著しく減少すると報告されている。本研究における全ての患者で、移植後 5 日以内にトラフ血中濃度が 15 ng/mL を上回り、白血球数が減少した患者は 6 名中 5 名であった。移植直後よりシロリムス血中濃度が特に高値を示した 2 名では、感染症予防のために G-CSF を投与した。これらの結果は、日本人における膵島移植後のシロリムスのより詳細な体内動態解析研究を実施し、適切な負荷投与量を設計する必要があることを示す。また、Anglicheau ら<sup>25)</sup>は、*CYP3A5\*1* 遺伝子多型を有する患者では、シロリムスを目標血中濃度に到達させるためにより多くの投与量を必要とすることを、腎移植患者を対象とした研究で明らかにした。そこで本研究においても、*CYP3A5* を発現する野生型である *CYP3A5\*1* と、*CYP3A5* を発現しない変異である *CYP3A5\*3* 遺伝子多型を検査したが、遺伝子型の影響は認められなかった。*CYP3A5* 遺伝子型はシロリムス体内動態に影響するが、膵島移植では膵島を門脈内に注入することによる移植直後の肝障害によって遺伝子型の影響が認められなかったものとする。

シロリムスからエベロリムスに変更した患者において、タクロリムス併用下でエベロリムスのトラフ血中濃度を 5-10 ng/mL に維持するためには、エベロリムスの投与量は 8-14 mg/day を必要とした。一方、シクロスポリンを併用する腎移植患者における報告では、同程度の血中濃度を維持するために必要なエベロリムス投与量は 1.5 ないし 3 mg/day とされている<sup>26, 27)</sup>。この相違は、併用するカルシニューリン阻害薬の違いによると考えられる。事実、Kovarík ら<sup>28)</sup>は、タクロリムス併用時には、シクロスポリン併用時に比べエベロリムス曝露量が 2.5 倍大きいと報告している。タクロリムス及びシクロスポリンがエベロリムス体内動態に及ぼす影響については、第 II 章で詳細

に記載する。

同一症例におけるシロリムス及びエベロリムスの体内動態を検討した結果、エベロリムスの C/D 比はシロリムスの C/D 比の約 1/3 であった。本研究期間中にシロリムスとエベロリムス以外で CYP3A 及び Pgp を阻害あるいは誘導する薬物の処方変更はなかった。また、肝障害はシロリムスのクリアランスを低下させるが<sup>29)</sup>、肝機能の変動も認めなかった。同様に CYP3A、Pgp の基質であるタクロリムスの血中濃度の変動も認められなかった。これらのことは、同じ血中濃度を得るためにはシロリムスよりエベロリムスの方が多くの投与量を必要とすることを示す。

エベロリムスの体内動態は個体間変動が大きいことが報告されているが<sup>30)</sup>、本研究における 2 症例でも体内動態に大きな違いが認められた。同一日における投与後の経時的濃度推移の結果から、両患者におけるトラフ血中濃度は同程度であったが、AUC には約 2 倍の開きが認められた。しかし、投与量補正した  $AUC_{0-8h}$  から算出したクリアランスは、2 症例で同程度になった。また、シロリムスとエベロリムスの血中濃度／投与量比は個体内で約 3 倍異なっていた。吸収過程において個体差があるものと推測する。一般にエベロリムスの治療域はトラフ血中濃度 3-8 ng/mL とされているが<sup>31)</sup>、AUC モニタリングの臨床的意義は明らかでない。

FPIA 法は薬物血中濃度測定において簡便な方法であるが、用いられる抗体の抗原特異性に精度は依存する。エベロリムスの FPIA 法に使用されている抗体は、代謝物にも交叉反応を示すことが報告されている<sup>32-34)</sup>。実際、LC/MS 法により測定した血中濃度と比較して、FPIA 法により測定した血中濃度は大きな値を示した。特に、シロリムスからエベロリムス切り替え直後に、FPIA と LC/MS 法による測定値の解離が大きかった。この原因は、エベロリムスはシロリムスの誘導体であるため、本研究で示した通りエベロリムスの FPIA 法で使われる抗体はシロリムスに交叉反応性を有することによる。従って、切り替え直後には FPIA 法では正確な血中濃度測定ができず、注意深い投与量設定が必要である。

以上、本章における検討より、臍島移植後のシロリムス血中濃度推移は、術後経過日数に応じてクリアランスが変化する POD-model が適していること、個々の症例においてシロリムスとエベロリムスのクリアランスは 3 倍異なることが明らかとなった。

## 第 II 章 エベロリムスの薬物間相互作用発現機構

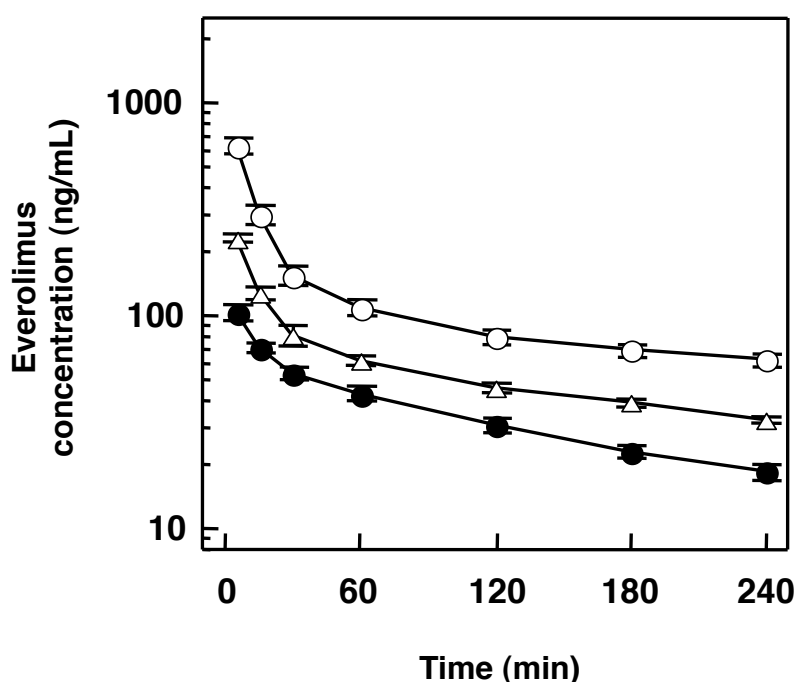
エベロリムスはシロリムスの 40 位に 2-ヒドロキシエチル基を導入した誘導体であり、シロリムスより吸収率が優れるとされる<sup>35)</sup>。免疫抑制薬として、本邦では腎・心移植後の治療に使用されている。

エベロリムスは速やかに吸収されるが、体内動態には個体間変動が大きく、Pgp 及び CYP3A4/5 の活性の影響を受ける<sup>5-7)</sup>。エベロリムスによる治療において、血中濃度が低ければ拒絶反応が生じ、高くなれば血球減少や脂質代謝異常症などの有害反応が生じやすくなるため、血中濃度モニタリングが推奨される<sup>31)</sup>。更に、Pgp や CYP3A4/5 の基質となる薬物との相互作用には注意を要する。シクロスポリン併用時にエベロリムスの血中濃度が上昇するとの報告があり<sup>35-37)</sup>、シクロスポリンによってエベロリムスの代謝が阻害されていると考えられている。しかし、もう一つのカルシニューリン阻害薬であるタクロリムスがエベロリムス体内動態に及ぼす影響は明らかではない。更に、エベロリムス初回通過における小腸と肝臓の寄与は定量的に求められておらず、薬物動態学的相互作用の詳細も判明していない。

第 1 節ではまず、ラットを用いて、初回通過効果における小腸及び肝臓の寄与率、及びシクロスポリンとタクロリムスがエベロリムス体内動態に及ぼす影響を評価した。第 2 節ではさらに、強力な CYP3A4/5 及び Pgp の阻害剤であるイトラコナゾールによるエベロリムス体内動態変動について評価した。

## 第 1 節 薬物動態における小腸及び肝臓初回通過効果の寄与

エベロリムス静脈内投与時の線形性を確認するために、0.2、0.5 及び 1 mg/kg のエベロリムスを雄性ラットに静脈内投与した。エベロリムス消失は、2 相性を示した (Fig. II-1)。クリアランスは投与量によって変動しなかったが ( $p=0.096$ )、分布容積は投与量によって変動した ( $p<0.05$ 、Table II-1)。



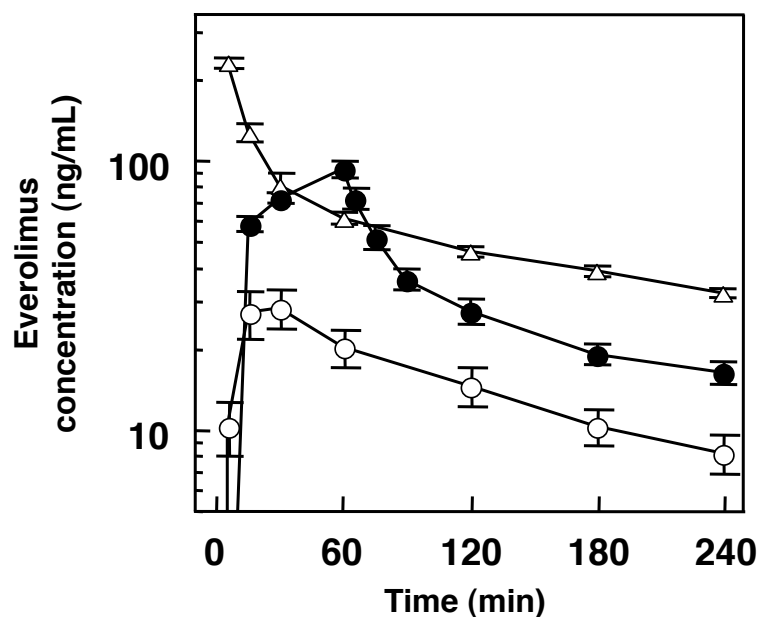
**Fig. II-1. Time-concentration profiles of everolimus after intravenous administration.** Blood concentrations of everolimus at a dose of 1 mg/kg (open circles;  $n=5$ ), 0.5 mg/kg (open triangles;  $n=5$ ) and 0.2 mg/kg (closed circles;  $n=6$ ) were plotted. Each line shows a simulation curve fitted to the two-compartment model. Each point shows the mean  $\pm$  SE.

**Table II-1. Total body clearance (CL) and volume of distribution at steady-state ( $V_{d_{ss}}$ ) after intravenous administration at a dose of 0.2, 0.5 or 1 mg/kg by the two-compartment model.**

Dose (mg/kg)	CL (L/hr/kg)	$V_{d_{ss}}$ (L/kg)
0.2 ( $n = 6$ )	$0.96 \pm 0.06$	$3.29 \pm 0.31$
0.5 ( $n = 5$ )	$1.25 \pm 0.04$	$5.55 \pm 0.63$
1.0 ( $n = 5$ )	$1.19 \pm 0.11$	$6.03 \pm 1.12$

Each value shows the mean  $\pm$  SE.

エベロリムスの初回通過効果における小腸及び肝臓の寄与率を明らかにするために、エベロリムス(0.5 mg/kg)を静脈内、門脈内及び小腸内に投与し、経時的に大腿動脈から採血を行った(Fig. II-2)。門脈内及び小腸内投与時のバイオアベイラビリティはそれぞれ 48.0%、21.2%であり(Table II-2)、このことから初回通過効果における小腸及び肝臓の寄与率はそれぞれ 44.2%、48.0%と算出できた。



**Fig. II-2. Time-concentration profiles of everolimus after intrainestinal, intraportal and intravenous administration.** Blood concentration of everolimus following intrainestinal (open circles; n=5), intraportal (closed circles; n=6) or intravenous (open triangles; n=3) administration at a dose of 0.5 mg/kg were plotted. Each point shows the mean  $\pm$  SE.

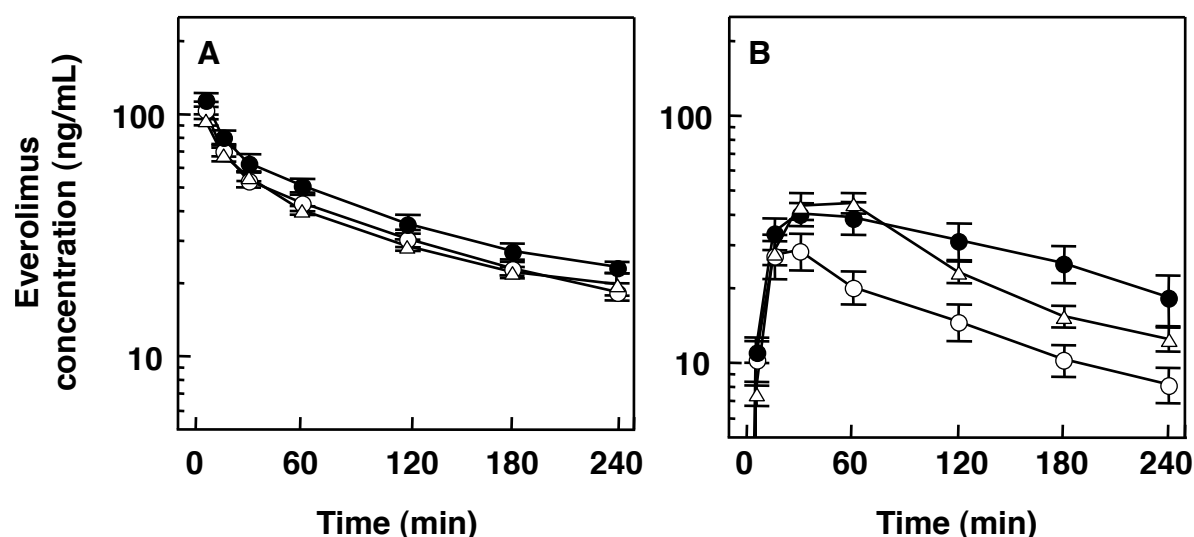
**Table II-2. Area under the blood concentration-time curve (AUC) and bioavailability following intravenous, intraportal or intrainestinal administration of everolimus in rats.**

Administration Route	Dose (mg/kg)	AUC * (mg $\cdot$ hr/L)	Bioavailability (%)
Intravenous (n = 3)	0.5	0.433 $\pm$ 0.027	-
Intraportal (n = 6)	0.5	0.208 $\pm$ 0.016	48.0
Intrainestinal (n = 5)	0.5	0.092 $\pm$ 0.015	21.2

\* Each value shows the mean  $\pm$  SE.



カルシニューリン阻害薬がエベロリムス体内動態へ及ぼす影響を明らかにするため、シクロスポリンあるいはタクロリムスを小腸内に前投与した後、エベロリムスを静脈内あるいは小腸内に投与した。静脈内投与の場合、シクロスポリンあるいはタクロリムスの前投与によりエベロリムス血中濃度の有意な上昇は認められなかったが (Fig. II-3A)、シクロスポリン前投与によって AUC 及びクリアランスの有意な変動が認められた (Table II-3)。一方、小腸内投与時には、シクロスポリンあるいはタクロリムス前投与によってエベロリムス血中濃度が上昇する傾向が認められた (Fig. II-3B)。シクロスポリン前投与の場合、統計学的に有意な差は認められなかったが、エベロリムスの AUC が約 2 倍に増加した (Table II-3)。エベロリムスのバイオアベイラビリティはコントロールでは 16.9% であり、シクロスポリンあるいはタクロリムスを併用することによりそれぞれ 29.5%、24.3% に上昇した。 (Table II-3)



**Fig. II-3. Effect of calcineurin inhibitors on blood concentration of everolimus in rats.** Blood concentrations of everolimus following intravenous (0.2 mg/kg, panel A) or intrainestinal (0.5 mg/kg, panel B) administration were plotted. Saline (open circles; control, n=6 for panel A, n=5 for panel B), 1 mg/kg of tacrolimus (open triangles; n=5 for panel A, n=4 for panel B) or 5 mg/kg of cyclosporine (closed circles; n=5 for panel A, n=5 for panel B) were intraintestinally administered 10 min before everolimus administration. Each point shows the mean  $\pm$  SE.

**Table II-3. Pharmacokinetic parameters of everolimus after intravenous and intrainestinal administration with or without administration of cyclosporine and tacrolimus by the non-compartment model.**

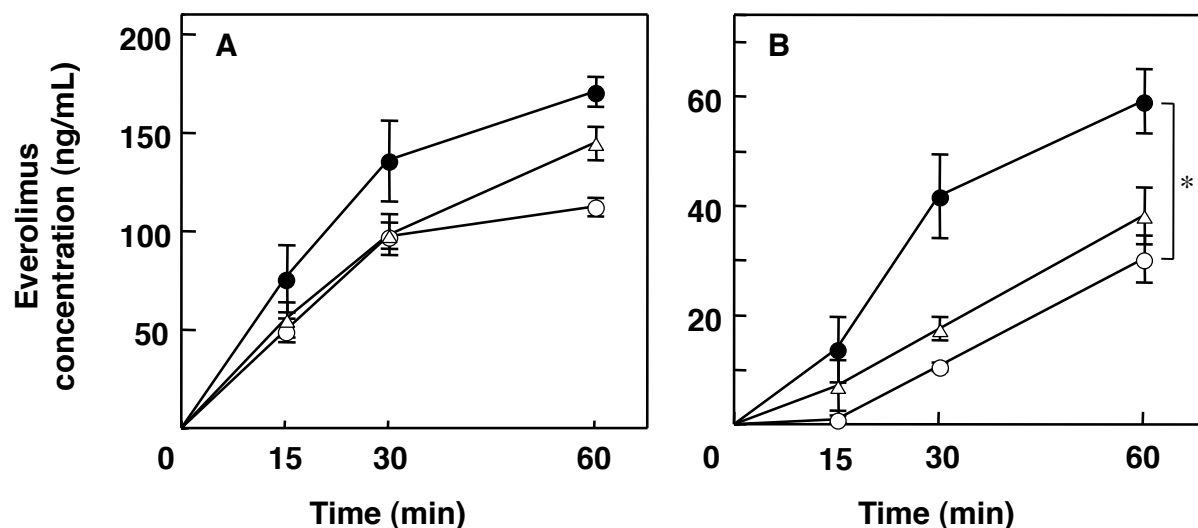
Parameter	Control	Cyclosporine	Tacrolimus
Intravenous administration (0.2 mg/kg)			
n	6	5	5
AUC (mg · hr/L)	0.217 ± 0.016	0.263 ± 0.013 *	0.226 ± 0.010
CL (L/hr/kg)	0.945 ± 0.068	0.768 ± 0.036 *	0.892 ± 0.038
Vd <sub>ss</sub> (L/kg)	3.47 ± 0.38	2.86 ± 0.24	3.55 ± 0.24
T <sub>1/2</sub> (hr)	3.65 ± 0.24	3.70 ± 0.14	3.97 ± 0.17
Intrainestinal administration (0.5 mg/kg)			
n	5	5	4
AUC (mg · hr/L)	0.092 ± 0.015	0.194 ± 0.045	0.137 ± 0.012
T <sub>max</sub> <sup>a</sup> (min)	30 (15-30)	60 (30-60)	60 (30-60)
C <sub>max</sub> (ng/mL)	28.9 ± 2.7	41.7 ± 4.6	44.5 ± 5.1
F (%)	16.9	29.5	24.3

AUC, Area under the blood concentration-time curve; CL, total body clearance; Vd<sub>ss</sub>, volume of distribution at steady-state; T<sub>1/2</sub>, half-life; T<sub>max</sub>, time of maximum blood concentration; C<sub>max</sub>, maximum blood concentration; F, oral bioavailability  
Each value shows the mean ± SE.

<sup>a</sup> Median (min-max)

\* p<0.05 compared with the control

次に、シクロスポリン及びタクロリムスのエベロリムス体内動態に及ぼす影響における小腸と肝臓の寄与を評価するため、エベロリムスを小腸内及び門脈内に持続投与した。エベロリムスを門脈内投与した場合には、シクロスポリンの小腸内前投与はエベロリムス血中濃度に影響を与えなかった (Fig. II-4A)。一方、小腸内持続投与時には、シクロスポリン前投与時によってエベロリムス血中濃度の有意な上昇が認められ (Fig. II-4B)、AUC<sub>0-60</sub> は約 3 倍に上昇した (Table II-4)。タクロリムス前投与によるエベロリムスの AUC<sub>0-60</sub> へ影響は認められなかった。



**Fig. II-4. Time-concentration profile of everolimus after intraportal infusion (A) and intrainestinal infusion (B) at a dose of 0.5 mg/kg.** Saline (open circles; control, n=5 for panel A, n=3 for panel B), 1 mg/kg of tacrolimus (open triangles; n=5 for panel A, n=4 for panel B) or 5 mg/kg of cyclosporine (closed circles; n=3 for panel A, n=4 for panel B) were intraintestinally administered 10 min before everolimus administration. Each point shows the mean  $\pm$  SE. \* p < 0.05 compared with control.

**Table II-4. Area under the blood concentration-time curve for 60 min ( $AUC_{0-60}$ , mg  $\cdot$  hr/L) values of everolimus after intraportal and intrainestinal infusion with or without administration of cyclosporine and tacrolimus.**

	Control	Cyclosporine	Tacrolimus
Intraportal	0.084 $\pm$ 0.004 (n = 5)	0.113 $\pm$ 0.014 (n = 3)	0.087 $\pm$ 0.007 (n = 5)
Intrainestinal	0.012 $\pm$ 0.001 (n = 3)	0.034 $\pm$ 0.005 * (n = 4)	0.018 $\pm$ 0.002 (n = 4)

Each point shows the mean  $\pm$  SE.

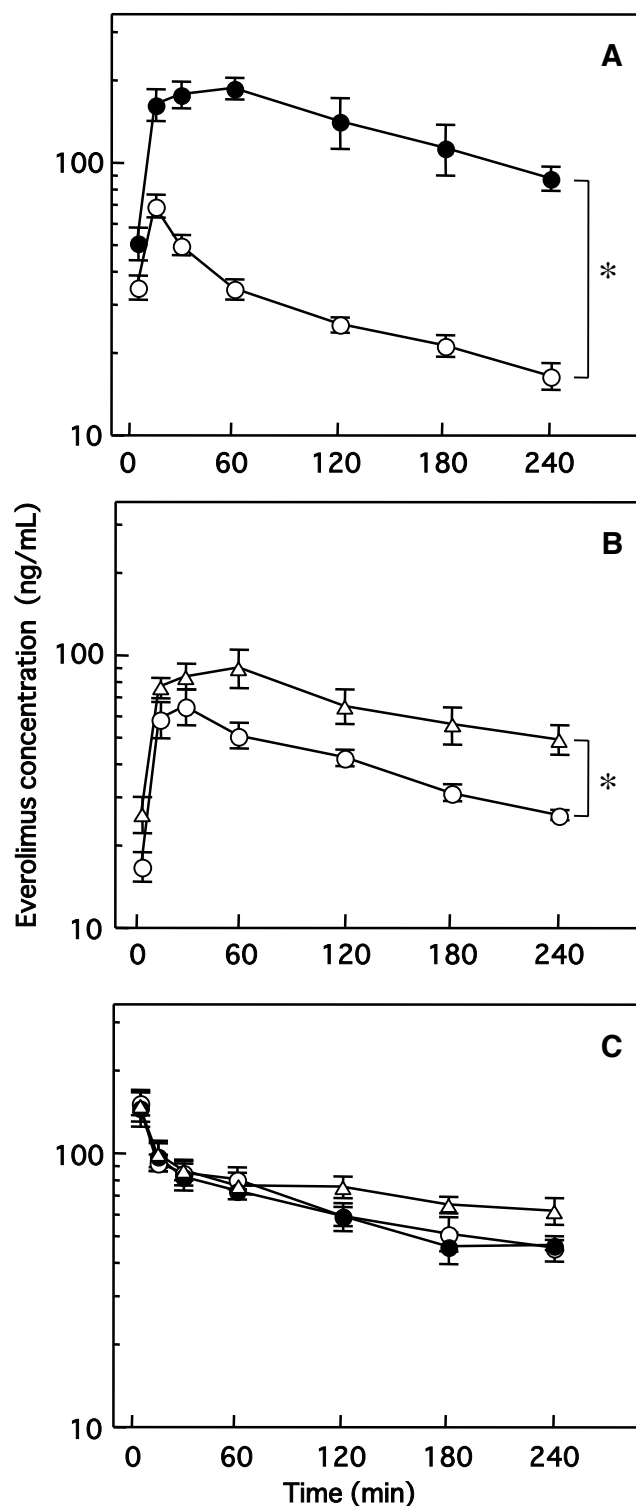
\* p<0.05 compared with the control.

## 第 2 節 イトラコナゾールとの相互作用における投与経路の影響

雄性ラットに、イトラコナゾール (20 mg/kg) を小腸内に投与し、その 10 分後にエベロリムス (0.5 mg/kg) を小腸内に投与した。Fig. II-5A に示すように、イトラコナゾール併用によってエベロリムスの血中濃度は上昇し、AUC は 4.5 倍に増加した。また、 $T_{max}$  は延長傾向を示し、 $C_{max}$  は約 3 倍に上昇したが、半減期の延長は認められなかった (Table II-5)。一方、イトラコナゾール (50 mg/kg) を静脈内投与し、10 分後にエベロリムス (0.5 mg/kg) を小腸内投与した場合には、AUC は有意な増加 (約 2 倍) を示したが、 $C_{max}$  及び半減期はコントロール (生理食塩水) 群との間に有意な差を認めなかった (Fig. II-5B、Table II-4A)。

次に、エベロリムス (0.2 mg/kg) の静脈内投与時におけるイトラコナゾールの影響を観察した。イトラコナゾールの静脈内投与 (50mg/kg) は、静脈内投与したエベロリムス (0.2mg/kg) の AUC 及び半減期を上昇させる傾向を示した。一方、小腸内投与したイトラコナゾール (50mg/kg) は、静脈内投与したエベロリムスの薬物動態パラメータに影響を与えなかった (Fig. II-5C、Table II-4B)。

エベロリムス小腸内投与時のバイオアベイラビリティは、コントロール群で約 18% であったが、イトラコナゾールの小腸内投与により 68.1% に上昇した。見かけの小腸抽出率は約 80% から 22% まで低下した (Table II-6)。これらの薬物動態パラメータから、エベロリムスの肝臓及び小腸における抽出率を算出した。コントロール群において、エベロリムスのバイオアベイラビリティは 18.3%、肝抽出率は 12.9%、小腸抽出率は 79% であった。イトラコナゾールを小腸内前投与することにより、エベロリムスの小腸抽出率は 21.5% まで低下し、バイオアベイラビリティは 68.1% へ上昇した。一方、肝抽出率はほとんど変動しなかった。イトラコナゾールを静脈内に投与した場合には、エベロリムスの肝抽出率は 12.9% から 7.7% へ低下したが、肝アベイラビリティ ( $F_h$ ) やバイオアベイラビリティへの影響はわずかであった。



**Fig. II-5. Effect of itraconazole on the blood concentrations of everolimus in rats.** In panel A, everolimus was administered intrainstestinally (0.5 mg/kg) 10 min after the intrainstestinal administration of itraconazole (20 mg/kg: closed circles, n=4) or saline (control: open circles, n=4). In panel B, everolimus was administered intrainstestinally (0.5 mg/kg) 10 min after the intravenous administration of itraconazole (50 mg/kg: open triangles, n=4) or saline (control: open circles, n=5). In panel C, everolimus was administered intravenously (0.2 mg/kg) 10 min after the intrainstestinal (50 mg/kg: closed circles, n=3) or intravenous administration of itraconazole (50 mg/kg: open triangles, n=4) or saline (control: open circles, n=4). \*  $p < 0.05$  compared with control.

**Table II-5. Pharmacokinetic parameters of everolimus with or without itraconazole.**

(A) Intraintestinal administration of everolimus (0.5 mg/kg)						
	AUC (mg·hr/L)	T <sub>max</sub> <sup>a</sup> (min)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	CL/F (L/hr/kg)	T <sub>1/2</sub> (hr)	
Control A (n = 4)	0.200 ± 0.025	15 (15-15)	69.0 ± 6.4	2.59 ± 0.27	3.38 ± 0.52	
Itraconazole (ii, 20 mg/kg, n = 4)	0.891 ± 0.095 <sup>b</sup>	60 (30-120)	201 ± 19 <sup>b</sup>	0.586 ± 0.077 <sup>b</sup>	2.84 ± 0.54	
Control B (n = 5)	0.289 ± 0.026	30 (15-30)	65.2 ± 9.7	1.78 ± 0.14	3.50 ± 0.63	
Itraconazole (iv, 50 mg/kg, n = 4)	0.548 ± 0.092 <sup>b</sup>	60 (15-60)	90.5 ± 10.5	1.01 ± 0.20 <sup>b</sup>	4.18 ± 0.70	
(B) Intravenous administration of everolimus (0.2 mg/kg)						
	AUC (mg·hr/L)	CL (L/hr/kg)	Vd (L/kg)	T <sub>1/2</sub> (hr)		
Control (n = 4)	0.542 ± 0.072	0.386 ± 0.042	2.26 ± 0.30	4.19 ± 0.61		
Itraconazole (ii, 50 mg/kg, n = 3)	0.505 ± 0.027	0.399 ± 0.021	2.14 ± 0.18	3.78 ± 0.48		
Itraconazole (iv, 50 mg/kg, n = 4)	0.993 ± 0.194	0.232 ± 0.055	2.20 ± 0.16	7.53 ± 1.63		

(A) Everolimus (0.5 mg/kg) was administered intraintestinally 10 min after the intraintestinal (ii, 20 mg/kg) or intravenous (iv, 50 mg/kg) administration of itraconazole or saline (control A and B, respectively).

(B) Everolimus (0.2 mg/kg) was administered intravenously after intraintestinal (ii) or intravenous (iv) administration of itraconazole (50 mg/kg).

AUC, Area under the blood concentration-time curve; T<sub>max</sub>, time of maximum blood concentration;

C<sub>max</sub>, maximum blood concentration; CL/F, apparent clearance; T<sub>1/2</sub>, half-life

Each value shows the mean ± SE.

<sup>a</sup> Median (min-max)

<sup>b</sup> p<0.05 compared with the control

**Table II-6. Calculated parameters of bioavailability (F), apparent intestinal and hepatic extraction ( $E'_g$ ,  $E_h$ ), apparent intestinal availability ( $F_a * F_g$ ) and hepatic availability ( $F_h$ ) for everolimus.**

(A) Intraintestinal administration of everolimus (0.5 mg/kg)			
	F (fold) <sup>b</sup>	$F_a * F_g$ (fold) <sup>b</sup>	$E'_g$ , (fold) <sup>b</sup>
Control A	0.149	0.171	0.829
Itraconazole (ii, 20 mg/kg)	0.681 (x 4.57)	0.785 <sup>a</sup> (x 4.59)	0.215 (x 0.259)
Control B	0.217	0.249	0.751
Itraconazole (iv, 50 mg/kg)	0.230 (x 1.06)	0.249 (x 1.00)	0.751 (x 1.00)
(B) Intravenous administration of everolimus (0.2 mg/kg)			
	$E_h$ (fold) <sup>b</sup>	$F_h$ (fold) <sup>b</sup>	
Control	0.129	0.871	
Itraconazole (ii, 50 mg/kg)	0.133 (x 1.03)	0.867 (x 0.995)	
Itraconazole (iv, 50 mg/kg)	0.077 (x 0.597)	0.923 (x 1.06)	

F, bioavailability;  $F_h$ , hepatic availability;  $F_a * F_g$ , apparent intestinal availability;  $E_h$ , hepatic extraction;  $E'_g$ , apparent intestinal extraction

<sup>a</sup> This value was calculated using the  $F_h$  value in the itraconazole (ii, 50 mg/kg).

<sup>b</sup> This value shows the ratio compared with each control.

## 考察

エベロリムスは CYP3A サブファミリーにより代謝される薬物であり<sup>5)</sup>、ヒトでは CYP3A4 及び CYP3A5 が肝臓及び小腸に発現している。成熟雄性ラットは肝臓に CYP3A2、CYP3A9、CYP3A18、CYP3A1/23、CYP3A62 を、小腸に CYP3A9、CYP3A18、CYP3A62 を発現する<sup>38)</sup>。Cao ら<sup>39)</sup>は、ヒトとラットでは代謝酵素の発現レベルや分布が異なることから、ラットにおける結果をヒトへ外挿するには注意が必要としている。一方、CYP3A の基質であるタクロリムスやシクロスポリンのヒトにおけるバイオアベイラビリティは小さく、かつ個人差が大きいことが知られている。タクロリムスのバイオアベイラビリティはヒトで 4%から 89%(平均 25%)<sup>40)</sup>、シクロスポリンでは 5%未満から 89%(平均 30%)<sup>41)</sup>とされており、ラットにおける値も同程度である<sup>42, 43)</sup>。エベロリムスは経口製剤しか発売されておらず、ヒトにおけるバイオアベイラビリティを直接求めることはできない。従って、エベロリムス体内動態に関する知見を得るために、ラットを用いた検討を行った。

エベロリムスの速度論的パラメータを算出するため、まず用量依存性を検討した。投与量が 0.2 から 1.0 mg/kg の範囲でクリアランスは一定であったが、分布容積は顕著に増大した。エベロリムスは血液中では赤血球内に多く分布するが、全血中濃度が高くなるにつれて赤血球への分布割合が低くなるとされており<sup>44)</sup>、血中濃度が上昇するにつれて分布容積だけでなくクリアランスも増加する可能性がある。腎移植患者において投与量補正したエベロリムスの AUC は、投与量が 2.5 から 25 mg の範囲では有意な差を認めなかったが、投与量が 0.75 mg では有意に大きな値を示したことが報告されている<sup>45)</sup>。本研究で検討した投与量範囲内では、静脈内投与後のエベロリムス体内動態は 2-コンパートメントモデルに良く一致したことから、エベロリムス体内動態は比較的狭い血中濃度域において線形性を示すと考えられる。エベロリムスを 0.2 mg/kg で静脈内投与した時の血中濃度範囲が 10-100 ng/mL であったことから、体内動態が線形性を示すこの血中濃度域で以降の検討を行うこととした。

初回通過効果における小腸と肝臓の寄与率を定量化するために、エベロリムスの小腸内、門脈内及び静脈内投与を行った(Fig. II-2)。その結果、小腸及び肝アベ



イラビリティはそれぞれ 42.2 及び 48.0%と算出され、小腸と肝臓がともにエベロリムスの吸収障壁となっていることが示された。これは、ラット十二指腸の *in situ* における研究結果から、約 50%が小腸粘膜にて代謝されるとする既報<sup>35)</sup>とも一致する。

京大病院における肝移植後早期におけるシクロスポリン血中濃度は、投与 2 時間後でおおよそ 600-1,000 ng/mL、タクロリムスのトラフ血中濃度は 10-20 ng/mL 程度である<sup>46, 47)</sup>。このことと既報<sup>42, 43)</sup>を参考に、本研究ではシクロスポリン及びタクロリムスの投与量をそれぞれ 5 及び 1 mg/kg と設定した。その結果、投与後 240 分時点のシクロスポリン及びタクロリムスの血中濃度は、それぞれ  $1,458 \pm 183$  及び  $3.8 \pm 0.9$  ng/mL (mean  $\pm$  SE) であった。シクロスポリンの小腸内投与は、エベロリムスのクリアランスを低下させ、バイオアベイラビリティを増加させた。一方、シクロスポリンと比較してタクロリムスはエベロリムスの体内動態への影響が小さいことが示された。ラットにシクロスポリン (2.5 mg/kg) とエベロリムス (0.6 mg/kg) を経口投与するとエベロリムスの血中濃度が上昇するとの報告がある<sup>35)</sup>。Kovarik ら<sup>37)</sup>は健常人において、シクロスポリン併用はエベロリムスの  $C_{max}$  と AUC をそれぞれ 84 及び 168% に上昇させることを報告している。一方、腎移植患者における検討で、タクロリムスはエベロリムス血中濃度に影響を及ぼさないとされている<sup>28)</sup>。シクロスポリンとタクロリムスは共に、ヒト肝ミクロソームにおける CYP3A によるニフェジピン酸化を抑制し、阻害定数はシクロスポリンで 1.42  $\mu$  M、タクロリムスで 0.36  $\mu$  M である<sup>48)</sup>。加えて、シクロスポリンは 20-25 nM の濃度域でベラパミル刺激 Pgp-ATPase 活性を阻害するが、タクロリムスは 100 nM 程度の濃度域で阻害する<sup>49)</sup>。これらを合わせて考察すると、タクロリムスはシクロスポリンと比較して臨床で用いられる血中濃度域が低いため、CYP3A や Pgp を介してのエベロリムス体内動態に及ぼす影響が小さいと考えられる。

シクロスポリンとの併用により、エベロリムスのバイオアベイラビリティは 1.75 倍に上昇したが、クリアランスは約 80% に低下した。この結果は、シクロスポリンがエベロリムスの肝代謝を阻害するだけでなく、小腸における初回通過効果を低下させることを示している。小腸及び肝臓におけるエベロリムス除去率に対するカルシニューリン阻害薬の影響を明らかにするため、カルシニューリン阻害薬を小腸内に投与後に、エベロリムスを小腸内及び門脈内に持続投与した。その結果、シクロスポリン前投与では、エベロリムスの血中濃度は門脈内よりも小腸内に投与した場合に上昇率が大きく、タクロリムスは有意な影響を与えなかった。このことから、エベロリムスの経口投

与時の相互作用には、小腸における初回通過効果への影響が重要であると考えられた。Thummel ら<sup>50)</sup>は、小腸上皮細胞の酵素はその組織学的分布によって、経口投与薬物の代謝における相互作用に重要な役割を示すとしている。本研究における肝臓と小腸における相互作用の強度の違いは、組織内の薬物濃度の違い、すなわち経口投与時には肝細胞よりも小腸上皮細胞の方が薬物に高濃度暴露されていることによると推測できる。

第2節では、エベロリムス及びシクロスポリンの薬物動態学的相互作用が CYP3A と Pgp を介したものであると仮定し、強力な CYP3A 及び Pgp 阻害薬による影響を検討した。阻害薬には、移植医療で併用処方されるケースが多いアゾール系抗真菌薬のひとつであるイトラコナゾールを選択した<sup>51)</sup>。

イトラコナゾールを小腸内あるいは静脈内に予め投与したラットに、エベロリムスを小腸内に投与し、その薬物動態の変化を観察した。エベロリムスの AUC は、イトラコナゾールの小腸内及び静脈内への前投与によって、それぞれ約 4.5 倍及び 2 倍に上昇した。この結果は、イトラコナゾールを静脈内に投与するよりも小腸内に投与した方が、小腸内投与したエベロリムスとの相互作用が大きいことを示す。エベロリムスの見かけの小腸抽出率は、イトラコナゾールの小腸内前投与によって約 1/4 に低下したが、肝抽出率に変動は認められなかった。一方、イトラコナゾールの静脈内投与によって、エベロリムス肝抽出率は約 60%まで低下したが、バイオアベイラビリティにはほとんど影響を及ぼさなかった。この結果から、イトラコナゾールは、小腸と肝臓のいずれにおいてもエベロリムスの代謝・排出を阻害するが、両薬物を小腸内に投与する場合に相互作用がより強く現れることが示された。これは、小腸内への投与時には小腸上皮細胞内のイトラコナゾールが高濃度になることに加えて、エベロリムスの小腸抽出率が大きいために影響を受けやすいと考察する。逆に、エベロリムスの見かけの小腸抽出率は静脈内投与されたイトラコナゾールの影響を受けなかったことは、静脈内投与されたイトラコナゾールの小腸への移行が少ないためと考えられる。

静脈内に投与したエベロリムスの血中濃度は、イトラコナゾールの小腸内への投与時には影響を受けなかったが、静脈内への投与によってわずかに上昇した。ラットにイトラコナゾール (10 mg/kg) を経口投与した際のバイオアベイラビリティは 34.9% と報告されている<sup>52)</sup>。従って、静脈内投与時と比較して、小腸内投与では肝臓中

のイトラコナゾール濃度が低くなり、肝臓の CYP3A によるエベロリムス代謝を十分に阻害できなかった可能性が考えられる。しかし、エベロリムス投与 240 分後におけるイトラコナゾール及び活性代謝物ヒドロキシイトラコナゾールの血中濃度を HPLC 法により測定したところ、イトラコナゾールの小腸内投与時にはそれぞれ約 1,500 及び 700 ng/mL であり、静脈内投与時にはそれぞれ約 4,500 及び 1,700 ng/mL であった。ヒトにイトラコナゾール(200 mg)を1日2回、3日間投与した後のトラフ血中濃度は 500-2,000 ng/mL と報告されており<sup>53)</sup>、本研究で測定された血中濃度域は臨床で用いられる濃度とほぼ同程度であると言える。

Kovarik ら<sup>54)</sup>は健常人を対象とした研究で、ケトコナゾール併用によってエベロリムスの AUC は約 15 倍に上昇することを報告している。ケトコナゾールは CYP3A 及び Pgp の強力な阻害薬である<sup>51)</sup>。ヒトにおけるエベロリムスのバイオアベイラビリティをラットと同程度(約 20%)と考えると、ケトコナゾールはエベロリムスの初回通過効果と肝クリアランスの両方を阻害すると考えられる。ヒト小腸及び肝ミクロソームを用いた研究で、典型的な CYP3A の基質であるミダゾラムの代謝への阻害効果は、イトラコナゾールよりケトコナゾールの方が強力であるとされている<sup>55)</sup>。従って、ヒトがエベロリムスとイトラコナゾールを併用した場合のエベロリムスの AUC の上昇率は、ラットの場合と同程度(約 5 倍)、少なくともケトコナゾール併用時より影響は小さいと推測される。

シクロスポリンとイトラコナゾールの薬物相互作用に関する報告は散見され、シクロスポリン血中濃度の上昇率は 40 から 226%とされている<sup>56)</sup>。また、タクロリムスとイトラコナゾールを併用した場合には、タクロリムス血中濃度は 2 から 6.6 倍上昇する<sup>56)</sup>。従って、イトラコナゾールを内服で併用する場合には、タクロリムスやシクロスポリンの投与量は 50-60%に減量し、免疫抑制薬の血中濃度をモニタリングすべきとされている<sup>51)</sup>。Leather ら<sup>56)</sup>は同種造血幹細胞移植患者を対象に、イトラコナゾールとシクロスポリンあるいはタクロリムスをいずれも静脈内投与で併用する試験を行っている。その結果、静脈内投与で併用する場合にはタクロリムスあるいはシクロスポリンの投与量の減量率は 50-100%としている。薬物動態の種差を考慮しても、イトラコナゾールとエベロリムスを経口投与で併用する際の相互作用は、イトラコナゾールをシクロスポリンあるいはタクロリムスと併用する場合よりも大きいと考えられる。一方、フルコナゾールを静脈内投与から経口投与に変更した後、静脈内投与のタクロリムス

やシクロスポリンの血中濃度はわずかに上昇するという報告もある<sup>57)</sup>。CYP3A 阻害薬の薬物動態学的特性は、投与経路も考慮する必要がある。ただし、著者らの本研究は、エベロリムスとイトラコナゾールの単一の投与量による検討であり、様々な投与方法が用いられる臨床への外挿は限定的にとらえるべきであると考ええる。

以上、ラットを用いた本研究から、エベロリムスの経口投与時には小腸で強く初回通過効果を受けることが判明した。更に、イトラコナゾールとの薬物動態学的相互作用は小腸における初回通過効果の低下が大きく寄与するため、共に経口投与した時にエベロリムスとの相互作用が強く現れることを定量的に明らかにした。



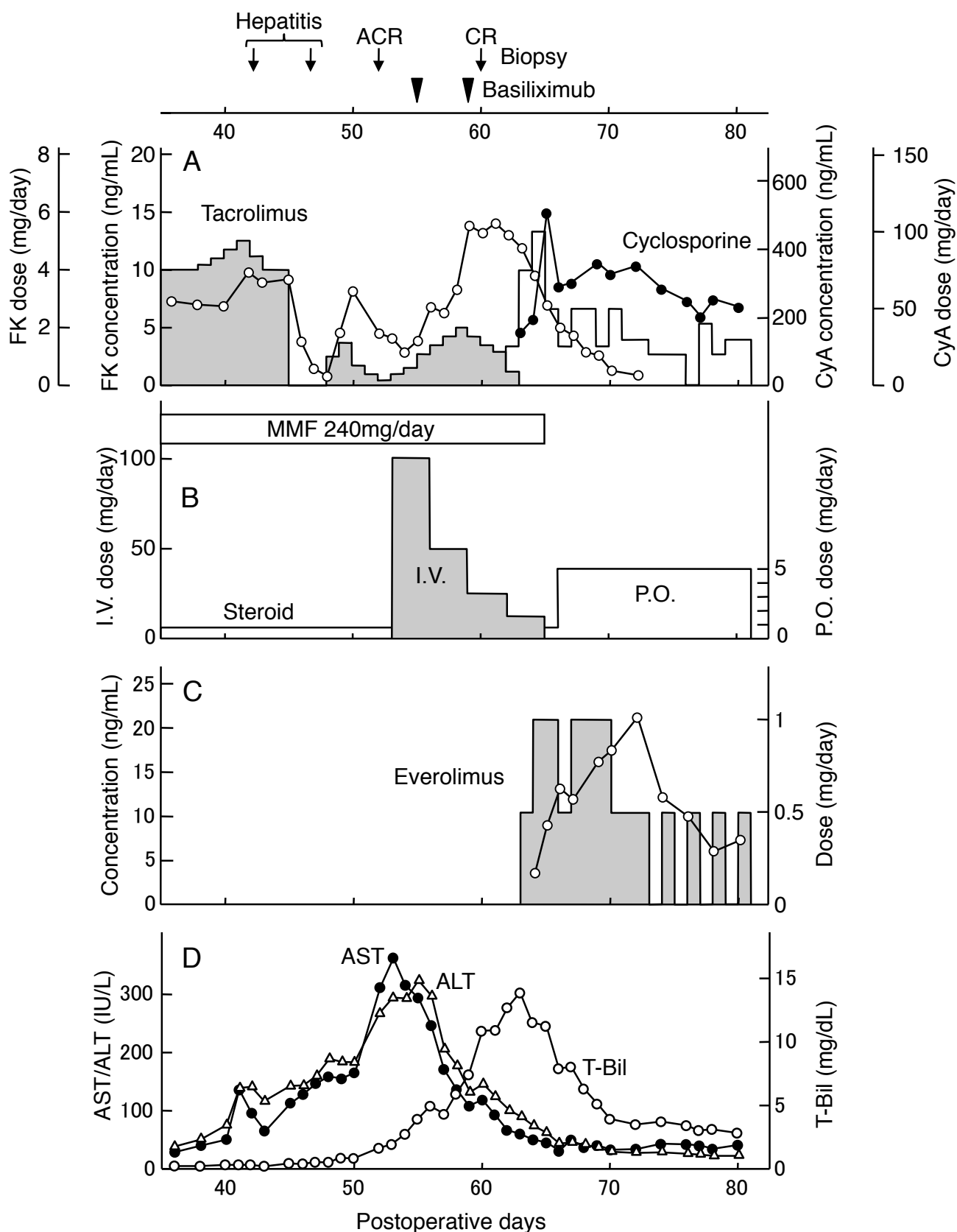
### 第 III 章 肝移植後の慢性拒絶に対する mTOR 阻害薬の有用性と薬物動態

肝移植は、末期肝不全患者に対する根治的な治療として定着しつつある。この移植治療の定着には、タクロリムスやシクロスポリンなどのカルシニューリン阻害薬の開発とそれらの適正使用のための研究成果の蓄積が大きく貢献している。しかしながら、カルシニューリン阻害薬を投与していても拒絶反応を生じることがある。拒絶反応には急性拒絶と慢性拒絶がある。急性拒絶反応は T 細胞を主とした細胞性拒絶反応である。臨床的にしばしば見られるが、ステロイドパルス療法によく反応し、予後良好であることが多い。一方、慢性拒絶反応は移植後数ヶ月から数年の単位で生じ、肝細胞の線維化・微細胆管の消失・閉塞性動脈性病変など、急性拒絶反応とは異なる様相を呈する。慢性拒絶反応は液性免疫が主体であり、T 細胞活性化を抑制するカルシニューリン阻害薬では抑制困難である。慢性拒絶反応に対する根本的な治療は再移植とされている。しかし、シロリムスやエベロリムスは mTOR を阻害することによって B 細胞の活性化を抑制することから、慢性拒絶反応に対する治療効果が期待できる。本章では、肝移植後慢性拒絶を生じた小児症例における mTOR 阻害薬の効果と体内動態の評価を行った。

症例は 6 ヶ月齢の女児で、急激に発症した高熱と黄疸のため居住地病院の集中治療室に入院した。原因不明の急性肝不全への対処として、血漿交換、持続的血液濾過、ステロイドパルス療法及びシクロスポリン投与を行ったが改善せず、肝性脳症 II 度と診断された。入院から 5 日後に肝移植適応として京大病院に転院した。入院日に、父親をドナーとする ABO 血液型適合生体部分肝移植が施行された。患児は、体重 8.1 kg、体表面積 0.39 m<sup>2</sup>であった。移植後 1 日目より、タクロリムスによる治療 (0.5 mg の内服を 12 時間毎) が開始された。タクロリムスの目標トラフ血中濃度を 10 ng/mL と設定して投与量の調節を行った。移植後は、タクロリムス、プレドニゾロン及びミコフェノール酸モフェチルの内服にて良好に経過していた。しかし移植後 42 日目に発熱し、肝生検にて肝炎と診断された。発熱は持続し、移植後 52 日目に実施した肝生検にて急性拒絶と診断された。急性拒絶に対しステロイ

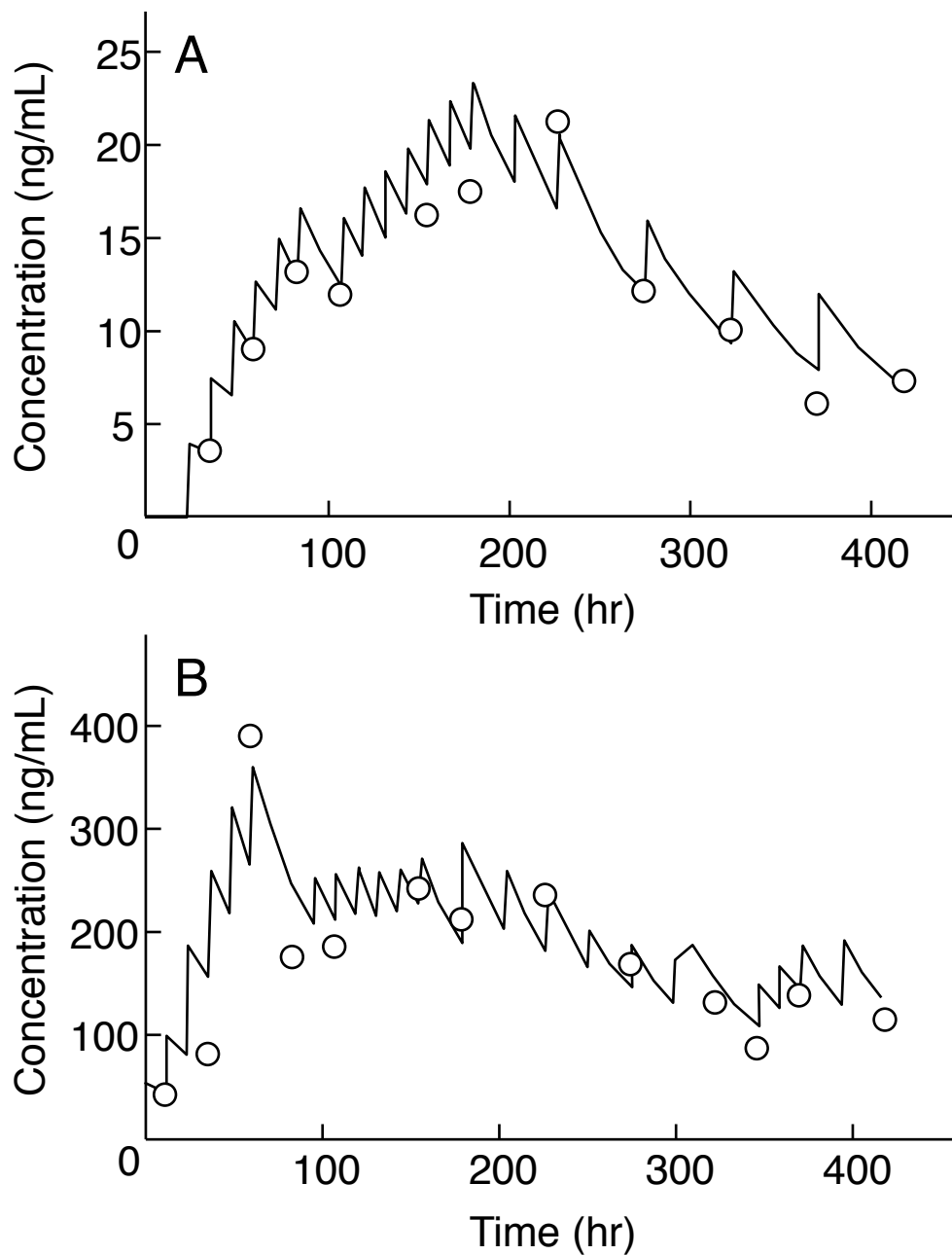
ドパルス療法を開始し、移植後 55 及び 59 日目にはバシリキシマブ (10 mg) が投与された。移植後 52 日目の AST と ALT はそれぞれ 310 及び 268 IU/L まで上昇していたが、移植後 60 日目にはそれぞれ 120 及び 145 IU/L まで低下した。しかし、血中総ビリルビン濃度 (T-Bil) は移植後 52 日目には 1.6 mg/dL であったが、移植後 60 日目には 10.8 mg/dL まで上昇し、同日施行した肝生検にて線維化の進行と胆管消失が認められ、慢性拒絶と診断された。そこで、慢性拒絶の治療のためにエベロリムスを投与することとなった。エベロリムスとタクロリムスはともに細胞内受容体 FKBP12 に結合する<sup>57)</sup>ため、移植後 62 日目にタクロリムスをシクロスポリンに変更し、移植後 63 日目にエベロリムスの投与を開始した。エベロリムスとシクロスポリンはそれぞれ 1 日 2 回の内服であり、目標トラフ血中濃度を 12-13 及び 180 ng/mL 前後として投与量を調節した。このエベロリムス目標血中濃度は、脾臓移植時のシクロリムス血中濃度を参考にした<sup>2)</sup>。この治療の結果、移植後 63 日目の T-Bil は 13.8 mg/dL であったが、移植後 77 日目には 3.0 mg/dL まで低下した。以降、目標トラフ血中濃度を 7 ng/mL 前後とするよう、エベロリムスを減量した。

エベロリムスとシクロスポリン血中濃度推移を 1-コンパートメントモデルに当てはめ、解析した。エベロリムス及びシクロスポリンともに、シミュレーション曲線は実測値によく一致した。エベロリムスの見かけのクリアランスは 0.147 L/hr/kg、分布容積は 12.6 L/kg と算出できた。同様に、シクロスポリンの見かけのクリアランスは 0.747 L/hr/kg、分布容積は 46.8 L/kg であった。



**Fig. III-1.** Dosage and blood concentration of tacrolimus (FK) or cyclosporine (CyA) (A); Dosage of steroid or mycophenolate mofetil (MMF) (B); Dosage and blood concentration of everolimus (C) and monitoring of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and total bilirubin (T-Bil) (D). Basiliximab was administered on postoperative days 55 and 59. Hepatitis, acute cellular rejection (ACR) or chronic rejection (CR) was diagnosed by biopsy as shown in panel A.





**Fig. III-2. Pharmacokinetic analyses of everolimus (A) and cyclosporine (B).** The open circles show measured blood trough concentrations. The solid lines represent simulation curves of the trough and peak concentrations.

## 考察

カルシニューリン阻害薬はT細胞の活性化を抑制する、すなわち細胞性免疫を抑制する<sup>59)</sup>。そのため、液性免疫が主体の慢性拒絶反応の抑制は困難である。一方、mTOR 阻害薬は、抗原及びサイトカインにより誘導されるB細胞増殖を抑制することにより<sup>60)</sup>、ヘルパーT細胞の制御とは独立してB細胞に作用する。従って、mTOR 阻害薬は液性免疫を抑制することから、慢性拒絶反応の治療効果を期待でき、再移植を回避できる可能性を持つ。

本症例は、ステロイドパルス療法不応の慢性拒絶反応症例に対してエベロリムス・シクロスポリン併用療法が著効した例である。Shinke ら<sup>61)</sup>は、シロリムスとタクロリムスの併用では効果不十分であったが、タクロリムスをシクロスポリンに変更したところ有効であったとする肝移植後慢性拒絶症例を報告している。この理由として、シロリムスとタクロリムスがFKBP12を競合するため<sup>62)</sup>、競合阻害を生じたと考えられる。エベロリムスもFKBP12に結合して効果を発揮することから<sup>58)</sup>、本症例ではエベロリムス開始前に、カルシニューリン阻害薬をタクロリムスからシクロスポリンへ変更した。その結果、T-Bilの著しい改善を認めた。エベロリムスには口内炎、脂質異常症、血小板減少等の副作用があり、血中濃度が高値になると発生頻度が上昇することが知られている<sup>63)</sup>。本症例では治療期間中、エベロリムスに関連すると考えられる有害反応は認められなかった。

エベロリムスとシクロスポリンの薬物動態学的相互作用については良く知られている。すなわち、シクロスポリンはエベロリムス血中濃度を上昇させるが、エベロリムスはシクロスポリン血中濃度に影響を与えない。これはCYP3A4への親和性と臨床における治療血中濃度域の相違によるとされている<sup>37)</sup>。しかしこれまでに、乳児肝移植症例におけるエベロリムス体内動態の報告はないため、血中濃度が定常に達するまで、著者らは頻回に血中濃度を測定し、投与量を調節した。後日、速度論的解析を行ったところ、予測値は実測値に良く一致しており、算出されたエベロリムスのクリアランスは0.147 L/hr/kg (3.05 L/hr/m<sup>2</sup>)であった。シクロスポリンを併用する小児腎移植症例におけるエベロリムスのクリアランスは、10.2あるいは5.9 L/hr/m<sup>2</sup>と報告されている<sup>64, 65)</sup>。一方、本症例におけるシクロスポリンのクリアランスは0.747 L/hr/kg

であったが、Wallemacq ら<sup>66)</sup>は小児肝移植症例におけるシクロスポリンのクリアランスを 2.92 L/hr/kg と報告している。本症例は肝移植後の慢性拒絶症例であり、肝代謝型薬物であるエベロリムス及びシクロスポリンのクリアランスが共に低下していたものと推測する。

以上、第 III 章の結果より、エベロリムスが肝移植後慢性拒絶反応の抑制に有効であると考えられる。また、肝移植後慢性拒絶を呈した小児においても、薬物動態速度論に基づく科学的な投与設計の可能性が示唆された。

## 結 論

以上三章にわたり、著者は mTOR 阻害薬の薬物動態について、移植患者及び実験動物における速度論的検討を行った。

### 第 I 章 臍島移植患者における mTOR 阻害薬の薬物動態特性

シロリムスとタクロリムスを併用した臍島移植患者で、移植後に一過性のシロリムスの血中濃度上昇が認められた。術後経過日数に応じて見かけのクリアランスが変化することを仮定した速度論的モデルを新規に作成したところ、血中濃度の予測値は実測値と良好な相関を示した。臍島移植では臍島を門脈内に注入することにより肝細胞に障害が生じるものと考えられる。その結果、肝代謝型薬物であるシロリムスのクリアランスが一時的に低下し、血中濃度上昇を生じた可能性が示唆された。

さらに、シロリムスからエベロリムスへの切り替えを行った臍島移植患者 2 例を対象に、シロリムスとエベロリムスの薬物動態を比較した。2 症例ともエベロリムスの血中濃度／投与量比は、シロリムスの約 1/3 を示した。この結果は、エベロリムスはシロリムスに比べて見かけのクリアランスが大きいいため、シロリムスからエベロリムスの切り替え時には同一血中濃度に維持するために投与量を約 3 倍に調節する必要があることを示唆する。本研究は同一個体内におけるシロリムス、エベロリムス体内動態を比較したはじめての報告であり、mTOR 阻害薬を用いた免疫抑制療法に有用な知見を提示するものとする。

### 第 II 章 エベロリムスの薬物間相互作用発現機構

エベロリムスの薬物動態についてラットを用いて詳細に検討したところ、投与量 0.2 ～1 mg/kg の範囲でエベロリムスの全身クリアランスは一定であった。また、エベロリムスを小腸内に投与した時のバイオアベイラビリティは約 20%、小腸及び肝での抽

出率は各々80 及び 13%と算出され、エベロリムスは小腸で強く初回通過効果を受けることが明らかとなった。さらに、タクロリムス併用時に比べて、シクロスポリン併用時においてエベロリムスのバイオアベイラビリティは大きく上昇した。エベロリムスを静脈内、門脈内及び小腸内投与して薬物動態を比較検討した結果、小腸における初回通過効果の阻害によりシクロスポリンとの相互作用が生じたことが示された。エベロリムスとシクロリムスはともに CYP3A 及び Pgp の基質であることから、相互作用は小腸の CYP3A 及び Pgp 競合によるものと推測された。そこで、移植医療で併用される事例も多い CYP3A 及び Pgp を強力に阻害するイトラコナゾールを用いた検討を行ったところ、小腸内投与後のイトラコナゾールは、エベロリムスの小腸での抽出率を約 1/4 に低下させるが、肝での見かけのアベイラビリティにほとんど影響を与えないことが速度論的に明らかとなった。従って、CYP3A 及び Pgp を介した薬物間相互作用の強度は投与経路に依存し、エベロリムスと CYP3A 及び Pgp を阻害する薬物を共に経口投与した場合に強く発現することが明らかとなった。

### 第 III 章 肝移植後の慢性拒絶に対する mTOR 阻害薬の有用性と薬物動態

肝移植後慢性拒絶反応を示した乳児症例について検討を行った。肝移植後の慢性拒絶に対してステロイド抵抗性を示したため、エベロリムスの投与を開始した。エベロリムス導入時には、T-Bil は 13.8 mg/dL と高値を示したが、エベロリムス導入 14 日目には 3.0 mg/dL まで低下した。液性免疫が関与する慢性拒絶反応には B 細胞増殖を抑制する mTOR 阻害薬が治療効果を発揮することが期待され、本症例は慢性拒絶反応の抑制にエベロリムスが有効であることを示したものである。また、エベロリムスのトラフ血中濃度推移は 1-コンパートメントモデルに基づく予測値と良好な対応を示したことから、肝移植後の慢性拒絶時においても薬物動態速度論に基づく科学的投与設計が今後の症例で可能であることが示唆された。

以上、著者は、mTOR 阻害薬の薬物動態について、移植患者及び実験動物における速度論的検討を行い、脾臓移植後一時的にシクロリムスクリアランスが低下

すること、シロリムスとエベロリムスは血中濃度／投与量比が3倍異なること、エベロリムスとCYP3A阻害薬の相互作用は共に経口投与した場合に強く発現すること、エベロリムスが肝移植後慢性拒絶反応を抑制する可能性があることを明らかにした。本研究成果は臨床におけるmTOR阻害薬の適正使用に有用な情報を与えるものとする。

## 謝 辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学医学部附属病院 松原和夫 教授、京都大学 乾 賢一 名誉教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、多くの有益な御指導と御助言を戴きました京都大学大学院薬学研究科 矢野育子 准教授、九州大学病院薬剤部 増田智先教授、立命館大学薬学部 桂 敏也教授に深謝致します。

さらに、臨床検体並びに臨床情報の提供にご協力下さいました京都大学医学研究科外科学講座(肝胆膵・移植外科分野) 上本伸二 教授、国立国際医療研究センター 松本慎一 膵島移植プロジェクト研究アドバイザーをはじめとする京都大学医学部附属病院肝胆膵移植外科、小児外科の諸先生方に深く感謝致します。そして、多くの御指導・御助言を戴きました京都大学医学部附属病院薬剤部諸氏、並びに研究の一部にご協力頂きました下村昌寛 博士、横増 晃 修士、端幸代 修士、谷口理沙 修士に心より感謝致します。

## 実 験 の 部

本研究に際して、試薬は特記しない限り以下のものを用いた。

### 【試薬】

#### Wyeth Pharmaceuticals

Sirolimus (Rapamune<sup>®</sup> tablet)

32-desmethoxyrapamycin

#### Novartis Pharma

Everolimus (Certican<sup>®</sup> injection, and microemulsion)

Cyclosporine (Sandimmun<sup>®</sup> injection)

#### Astellas Pharma

Tacrolimus (Prograf<sup>®</sup> injection)

#### Janssen Pharmaceutical K.K.

Itraconazole (Itrazole<sup>®</sup> injection, and oral solution)

上記以外は市販の特級品を用いた。

### 【実験動物】

Wistar/ST 系雄性ラット(8 週齢、清水実験材料)を用い、実験に用いるまで恒温(22-24℃)、水と固形試料を自由に摂取できる条件下で飼育した。動物実験は、京都大学動物実験に関する指針を遵守して行った。



## 第 I 章 実験の部

### 【1】膵島移植患者とデータ収集

2004 年 4 月から 2004 年 11 月の期間に、京都大学医学部附属病院にて心停止ドナーから膵島移植術を施行された 6 名を対象とした。何れの患者も 1 型糖尿病歴が 5 年以上で、空腹時及びグルカゴン負荷時における血清 C-ペプチドがそれぞれ 0.3 ないし 0.5 ng/mL 未満であり、インスリン療法にも拘らず血糖コントロール不良であった。膵島移植術は日本膵・膵島移植研究会作成の膵島移植実施マニュアルに準じて実施した。データは診療録から収集した。

本研究は、京都大学医学研究科・医学部医の倫理委員会の承認を得、十分なインフォームド・コンセントを行った上で実施した。

### 【2】膵島移植術後の免疫抑制療法

免疫抑制療法はエドモントンプロトコル<sup>2)</sup>を一部改変して行った<sup>10)</sup>。シロリムスは 1 日 1 回、移植直前には 0.2 mg/kg、翌日は 0.1 mg/kg を経口投与し、以降はトラフ血中濃度を 12-15 ng/mL となるよう投与量を調節した。タクロリムスは、移植当日は 1 mg を経口投与し、以降は 1 日 2 回投与とし、トラフ血中濃度が 3-6 ng/mL となるよう投与量を調節した。ベバシズマブを移植直前及び移植後 4 日目に静脈内投与した。

### 【3】免疫抑制薬の定量

#### (1) 第 1 節

Campanero ら<sup>67)</sup>の報告を参考に全血を処理し、シロリムスは high performance liquid chromatography (HPLC) 法にて測定した。移動相は A 液 (水:メタノール=1:2) と B 液 (アセトニトリル) のグラジエント溶出とし、移動相流速は 1 mL/min、カラム温度は 50 °C に設定した。シロリムス及び内部標準物質 (32-desmethoxyrapamycin) は UV 227 nm で検出した。定量の下限は 5 ng/mL であった。タクロリムス全血中濃度は、semiautomated microparticle enzyme immunoassay 法 (IMx<sup>®</sup>; Abbott, Tokyo, Japan) によって測定した。

## (2)第 2 節

エベロリムス全血中濃度は、FPIA 法 (TDxFLx<sup>®</sup>; Abbott, Tokyo, Japan) によって採血当日に測定した。

FPIA 法によるエベロリムス測定後の残血は-80℃にて保管した。保管血液中のシロリムス及びエベロリムス血中濃度は、Novartis Pharma S.A.S.社の研究所(フランス)において high performance liquid chromatography with mass spectrometry (LC/MS) 法にて測定した。定量の限界はシロリムス 0.5 ng/mL、エベロリムス 0.3 ng/mL であった

### 【4】臍島移植術後の薬物動態解析

移植直後 2 週間のシロリムス体内動態は、繰り返し急速静注の 1-コンパートメントモデルに当てはめ、NONMEM ソフトウェア (double precision NONMEM Version V and PREDPP Version III) を用いて解析した<sup>68)</sup>。1-コンパートメントモデル用 PREDPP サブルーチンの ADVAN1 と TRANS2 を用いて、移植後のクリアランスが一定としたモデル (Basic-model) と、移植後経日的にクリアランスが変化するモデル (POD-model) における見かけの全身クリアランス (CL/F)、見かけの分布容積 (V/F) を求めた。

$$\text{Basic-model: CL/F} = \theta_1 * \text{WT}$$

$$\text{V/F} = \theta_2 * \text{WT}$$

$$\text{POD-model: CL/F} = (\theta_1 + \theta_3 * \text{POD/X}) * \text{WT} \quad (\text{POD} \leq X)$$

$$\text{CL/F} = (\theta_1 + \theta_3) * \text{WT} \quad (\text{POD} > X)$$

$$\text{V/F} = \theta_2 * \text{WT}$$

ここで、WT は体重、 $\theta_1$ 、 $\theta_2$ 、 $\theta_3$  は算出されたパラメータ、POD は術後経過日数、X は 2 から 14 までの任意の整数である。消失半減期 ( $T_{1/2}$ ) は、 $T_{1/2} = (V/F)/(CL/F)$  として算出した。モデルの適合性については、objective function の値を用いた。

### 【5】CYP3A5 遺伝子多型解析

ゲノム DNA は全血から MagNAPure LC DNA isolation kit (Roche, Mannheim, Germany) を用いて抽出した。CYP3A5\*3 多型の解析は PCR-RFLP 法により、van

Schaik ら<sup>69)</sup>の方法を用いて行った。

#### 【6】シロリムスとエベロリムスの体内動態比較

脾臓移植後シロリムス投与継続している患者を対象に、エベロリムス投与量は目標血中濃度を 12-15 ng/mL として調節した。

#### 【7】エベロリムス測定用抗体のシロリムスへの交叉反応性

ヒト全血中に 5、10、20、50 ng/mL となるようシロリムスを加え、エベロリムスの FPIA 法 (TDxFLx<sup>®</sup>; Abbott, Tokyo, Japan) にて測定した。

#### 【8】エベロリムスの経時的採血

エベロリムス血中濃度は定常状態になった後、経時的採血を実施した。午前の投与の直前、投与後 1、2、4、8 時間後に採血を行った。エベロリムス血中濃度は前述の LC/MS 法にて測定した。

## 第 II 章 実験の部

#### 【1】エベロリムス初回通過効果

Wistar/ST 系雄性ラット(8 週齢)を用い、ペントバルビタール麻酔下で大腿動脈と大腿静脈にカニューレを挿入した。

エベロリムス 0.2-1 mg/kg を静脈内あるいは小腸内に瞬時投与し、5、15、30、60、120、180、240 分後に大腿動脈より採血を行なった。また、エベロリムス 0.5 mg/kg を門脈内より 60 分間定速注入し、投与開始後 15、30、60 分、投与終了後 5、15、30、60、120、180 分の時点で大腿動脈より採血を行なった。投与液は、Certican<sup>®</sup>マイクロエマルジョン製剤を蒸留水、他は生理食塩水を用いて希釈し調製した。

#### 【2】エベロリムスとカルシニューリン阻害薬の薬物動態学的相互作用の検討

Wistar/ST 系雄性ラット(8 週齢)を用い、ペントバルビタール麻酔下で大腿動脈と大腿静脈にカニューレを挿入した。胃の幽門直下を結紮し、タクロリムス 1 mg/kg あ

るいはシクロスポリン 5 mg/kg を小腸内に投与した。10 分後にエベロリムス 0.2-1 mg/kg を静脈内あるいは小腸内に瞬時投与し、5、15、30、60、120、180、240 分後に大腿動脈より採血を行なった。また、エベロリムス 0.5 mg/kg を門脈内より 60 分間定速注入し、投与開始後 15、30、60 分、投与終了後 5、15、30、60、120、180 分の時点で大腿動脈より採血を行なった。次いで、エベロリムス 0.5 mg/kg を門脈内あるいは小腸内より 60 分間定速注入し、投与開始後 15、30、60 分の時点で大腿動脈より採血を行なった。投与液は、Certican<sup>®</sup>マイクロエマルジョン製剤を蒸留水、他は生理食塩水を用いて希釈し調製した。

### 【3】エベロリムスとイトラコナゾールの相互作用

実験には 8 週齢の Wistar/ST 系雄性ラットを用いた。ペントバルビタール麻酔下、大腿動脈と大腿静脈にカニューレを挿入した。また、胃の幽門直下を結紮し、イトラコナゾール (20 または 50 mg/kg、Itrazole<sup>®</sup>内用液または注) を小腸内あるいは静脈内に投与した。10 分後、エベロリムス (0.5 mg/kg、マイクロエマルジョン製剤または注射用製剤) を小腸内あるいは静脈内に瞬時投与し 5、15、30、60、120、180、240 分後に大腿動脈より採血を行った。コントロール群にはイトラコナゾールの代わりに生理食塩水を投与した。

### 【4】エベロリムスの定量

エベロリムス血中濃度は high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry にて測定した。サンプル処理は第 I 章【3】(1)に準じた。移動相は 1 mM 酢酸アンモニウム水と、1 mM 酢酸アンモニウムを含むメタノールのグラジエント溶出とし、移動相流速は 0.6 mL/min、カラム温度は 60 °C に設定した。検出は陽イオンモードにて、エベロリムスは m/z 975.6 → 908.6、内部標準物質 (32-desmethoxyrapamycin) は m/z 901.5 → 834.4 として行なった。定量の下限は 0.5 ng/mL であった。

## 【5】体内動態解析

### (1)第 1 節

エベロリムスの体内動態パラメータは、プログラム WinNonlin version 4.0.1 (Pharsight Co.)を用い、用量依存性の検討では 2-compartment model、以降の検討では non-compartment model にあてはめて算出した。静脈内投与後の消失半減期 ( $T_{1/2}$ ) は、クリアランス (CL) と分布容積 ( $V_{d_{ss}}$ ) より算出した。小腸内投与後のバイオアベイラビリティ (F)、見かけの小腸アベイラビリティ ( $F_i$ )、肝アベイラビリティ ( $F_h$ ) は静脈内、門脈内あるいは小腸内投与後の、投与量で補正後の曲線下面積 (AUC) の比により算出した。すなわち、

$$F = (AUC_{ii}/Dose_{ii})/(AUC_{iv}/Dose_{iv})$$

$$F_i = (AUC_{ii}/Dose_{ii})/(AUC_{ipv}/Dose_{ipv})$$

$$F_h = (AUC_{ipv}/Dose_{ipv})/(AUC_{iv}/Dose_{iv})$$

ここで、 $AUC_{iv}$ 、 $AUC_{ipv}$ 、 $AUC_{ii}$  はそれぞれ、静脈内、門脈内あるいは小腸内投与後の AUC であり、 $Dose_{iv}$ 、 $Dose_{ipv}$ 、 $Dose_{ii}$  はそれぞれ、静脈内、門脈内あるいは小腸内投与時の投与量である。

### (2)第 2 節

エベロリムスの体内動態パラメータは、プログラム WinNonlin version 4.0.1 (Pharsight Co.)を用い、non-compartment model に当てはめて算出した。肝抽出率 ( $E_h$ ) は下記の式より、肝血流量の文献値 ( $Q$ , 50mL/min/kg)<sup>70)</sup>を用いて算出した。小腸内投与後のバイオアベイラビリティ (F)、肝アベイラビリティ ( $F_h$ )、見かけの小腸アベイラビリティ ( $F_a * F_g$ )、及びみかけの小腸抽出率 ( $E'_g$ ) は以下の式より算出した。

$$E_h = CL/Q$$

$$F = (AUC_{ii}/Dose_{ii})/(AUC_{iv}/Dose_{iv})$$

$$F_h = 1 - E_h$$

$$F_a * F_g = F/F_h$$

$$E'_g = 1 - F_a * F_g$$

ここで、 $F_a$ 、 $F_g$  はそれぞれ、吸収及び小腸アベイラビリティを示す。

## 第 III 章 実験の部

### 【1】肝移植患者とデータ収集

京都大学医学部附属病院にて生体肝移植術を施行された患者を対象に、データは治療記録から収集した。

本研究は、京都大学医学研究科・医学部医の倫理委員会の承認を得、十分なインフォームド・コンセントを行った上で実施した。

### 【2】免疫抑制薬の定量

エベロリムスの定量は、第 II 章【4】に準じて行った。

タクロリムスの定量は、chemiluminescent enzyme immunoassay 法 (ARCHITECT<sup>®</sup>; Abbott, Tokyo, Japan) により行った。

シクロスポリンの定量は、antibody-conjugated magnetic immunoassay 法 (Dimension<sup>®</sup>; Siemens Japan, Tokyo, Japan) により行った。

### 【3】体内動態解析

エベロリムス及びシクロスポリン体内動態は、繰り返し急速静注の 1-コンパートメントモデルに当てはめ、NONMEM ソフトウェア (double precision NONMEM Version V and PREDPP Version III) を用いて解析した<sup>68)</sup>。

## 論文目録

本研究の内容は、以下の論文に発表した。

Temporal decline in sirolimus elimination immediately after pancreatic islet transplantation.

*Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **21**: 492-500, 2006

Effect of intestinal and hepatic first-pass extraction on the pharmacokinetics of everolimus in rats.

*Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **23**: 469-475, 2008

Larger dosage required for everolimus than sirolimus to maintain same blood concentration in two pancreatic islet transplant patients with tacrolimus.

*Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **24**: 175-179, 2009

Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of everolimus administered by different routes in rats.

*Biopharmaceutics and Drug Disposition* **30**: 517-523, 2009

Effectiveness of everolimus in combination with cyclosporine as treatment for chronic rejection in a pediatric patient undergoing liver transplantation.

*Japanese Journal of Therapeutic Drug Monitoring* **31**: 1-5, 2014

## 引用文献

1. Matsumoto S. Islet cell transplantation for Type 1 diabetes. *J Diabetes*, **2**: 16-22, 2010.
2. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet Transplantation in Seven Patients with Type 1 Diabetes Mellitus Using a Glucocorticoid-Free Immunosuppressive Regimen. *N Engl J Med*, **343**: 230-238, 2000.
3. 松本慎一. 膵島移植. *最新医学* **61**: 1529-1533, 2006.
4. Neuhaus P, Klupp J, Langrehr JM. mTOR inhibitors: an overview. *Liver Transpl*, **7**: 473-484, 2001.
5. Jacobsen W, Serkova N, Hausen B, Morris RE, Benet LZ, Christians U. Comparison of the in vitro metabolism of the macrolide immunosuppressants sirolimus and RAD. *Transplant Proc*, **33**: 514-515, 2001.
6. Crowe A, Lemaire M. In vitro and in situ absorption of SDZ-RAD using a human intestinal cell line (Caco-2) and a single pass perfusion model in rats: comparison with rapamycin. *Pharm Res*, **15**: 1666-1672, 1998.
7. Hebert MF. Contributions of hepatic and intestinal metabolism and P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, **27**: 201-214, 1997.
8. Stenton SB, Partovi N, Ensom MH. Sirolimus: the evidence for clinical pharmacokinetic monitoring. *Clin Pharmacokinet* **44**: 769-786, 2005.
9. Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP. Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clin Pharmacokinet*, **43**: 83-95, 2004.
10. Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, Yonekawa Y, Yamada Y, Fukuda K, Shibata T, Kasai Y, Maekawa T, Wada H, Nakamura T, Tanaka K. Successful islet transplantation from nonheartbeating donor pancreata using modified Ricordi islet isolation method. *Transplantation*,



**82:** 460-465, 2006.

11. Berney T, Buhler LH, Majno P, Mentha G, Morel P. Immunosuppression for pancreatic islet transplantation. *Transplant Proc*, **36**: 362S-366S, 2004.
12. Rafael E, Ryan EA, Paty BW, Oberholzer J, Imes S, Senior P, McDonald C, Lakey JR, Shapiro AM. Changes in liver enzymes after clinical islet transplantation. *Transplantation*, **76**: 1280-1284, 2003.
13. Barshes NR, Wyllie S, Goss JA. Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. *J Leukoc Biol*, **77**: 587-597, 2005.
14. Ferron GM, Mishina EV, Zimmerman JJ, Jusko WJ. Population pharmacokinetics of sirolimus in kidney transplant patients. *Clin Pharmacol Ther*, **61**: 416-428, 1997.
15. Zimmerman JJ, Kahan BD. Pharmacokinetics of sirolimus in stable renal transplant patients after multiple oral dose administration. *J Clin Pharmacol*, **37**: 405-415, 1997.
16. Miller DS, Fricker G, Drewe J. P-glycoprotein-mediated transport of a fluorescent rapamycin derivative in renal proximal tubule. *J Pharmacol Exp Ther*, **282**: 440-444, 1997.
17. Zimmerman JJ, Harper D, Getsy J, Jusko WJ. Pharmacokinetic interactions between sirolimus and microemulsion cyclosporine when orally administered jointly and 4 hours apart in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, **43**: 1168-1176, 2003.
18. McAlister VC, Mahalati K, Peltekian KM, Fraser A, MacDonald AS. A clinical pharmacokinetic study of tacrolimus and sirolimus combination immunosuppression comparing simultaneous to separated administration. *Ther Drug Monit*, **24**: 346-350, 2002.
19. Wu FL, Tsai MK, Chen RR, Sun SW, Huang JD, Hu RH, Chen KH, Lee PH. Effects of calcineurin inhibitors on sirolimus pharmacokinetics during staggered administration in renal transplant recipients. *Pharmacotherapy*, **25**: 646-653, 2005.

20. Tortorici MA, Parks V, Matschke K, Korth-Bradley J, Patat A. The evaluation of potential pharmacokinetic interaction between sirolimus and tacrolimus in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. **69**: 835-842, 2013.
21. Lampen A, Zhang Y, Hackbarth I, Benet LZ, Sewing KF, Christians U. Metabolism and transport of the macrolide immunosuppressant sirolimus in the small intestine. *J Pharmacol Exp Ther*. **285**: 1104-1112, 1998.
22. Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, Yonekawa Y, Yamada Y, Fukuda K, Tsukiyama K, Suzuki H, Kawasaki Y, Shimodaira M, Matsuoka K, Shibata T, Kasai Y, Maekawa T, Shapiro J, Tanaka K. Insulin independence after living-donor distal pancreatectomy and islet allotransplantation. *Lancet*, **365**: 1642-1644, 2005.
23. Hong JC, Kahan BD. Sirolimus-induced thrombocytopenia and leukopenia in renal transplant recipients: risk factors, incidence, progression, and management. *Transplantation*, **69**: 2085-2090, 2000.
24. Dansirikul C, Duffull SB, Morris RG, Tett SE. Relationships between sirolimus dosing, concentration and outcomes in renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol*, **60**: 560-565, 2005.
25. Anglicheau D, Le Corre D, Lechaton S, Laurent-Puig P, Kreis H, Beaune P, Legendre C, Thervet E. Consequences of genetic polymorphisms for sirolimus requirements after renal transplant in patients on primary sirolimus therapy. *Am J Transplant*, **5**: 595-603, 2005.
26. Kovarik JM, Kaplan B, Silva HT, Kahan BD, Dantal J, McMahon L, Berthier S, Hsu CH, Rordorf C. Pharmacokinetics of an everolimus-cyclosporine immunosuppressive regimen over the first 6 months after kidney transplantation. *Am J Transplant*, **3**: 606-613, 2003.
27. Kovarik JM, Dantal J, Civati G, Rizzo G, Rouilly M, Bettoni-Ristic O, Rordorf C. Influence of delayed initiation of cyclosporine on everolimus pharmacokinetics in de novo renal transplant patients. *Am J Transplant*, **3**: 1576-1580, 2003.

28. Kovarik JM, Curtis JJ, Hricik DE, Pescovitz MD, Scantlebury V, Vasquez A. Differential pharmacokinetic interaction of tacrolimus and cyclosporine on everolimus. *Transplant Proc*, **38**: 3456-3458, 2006.
29. Zimmerman JJ, Lasseter KC, Lim HK, Harper D, Dilzer SC, Parker V, Matschke K. Pharmacokinetics of sirolimus (rapamycin) in subjects with mild to moderate hepatic impairment. *J Clin Pharmacol*, **45**: 1363-1372, 2005.
30. Kovarik JM, Kahan BD, Kaplan B, Lorber M, Winkler M, Rouilly M, Gerbeau C, Cambon N, Boger R, Rordorf C: Everolimus Phase 2 Study Group. Longitudinal assessment of everolimus in de novo renal transplant recipients over the first post-transplant year: pharmacokinetics, exposure-response relationships, and influence on cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther*, **69**: 48-56, 2001.
31. Mabasa VH, Ensom MH. The role of therapeutic monitoring of everolimus in solid organ transplantation. *Ther Drug Monit*, **27**: 666-676, 2005.
32. Strom T, Haschke M, Boyd J, Roberts M, Arabshahi L, Marbach P, Christians U. Crossreactivity of isolated everolimus metabolites with the Innofluor Certican immunoassay for therapeutic drug monitoring of everolimus. *Ther Drug Monit*, **29**: 743-749, 2007.
33. Salm P, Warnholtz C, Boyd J, Arabshahi L, Marbach P, Taylor P J. Evaluation of a fluorescent polarization immunoassay for whole blood everolimus determination using samples from renal transplant recipients. *Clin Biochem*, **39**: 732-738, 2006.
34. Khoschorur G, Fruehwirth F, Zelzer S, Stettin M, Halwachs-Baumann G. Comparison of fluorescent polarization immunoassay (FPIA) versus HPLC to measure everolimus blood concentrations in clinical transplantation. *Clin Chim Acta*, **380**: 217-221, 2007.
35. Crowe A, Bruelisauer A, Duerr L, Guntz P, Lemaire M. Absorption and intestinal metabolism of SDZ-RAD and rapamycin in rats. *Drug Metab Dispos*, **27**: 627-632, 1999.

36. Hausen B, Boeke K, Berry GJ, Segarra I, Benet LZ, Christians U, Morris RE. Coadministration of neoral and the novel rapamycin analog, SDZ RAD, to rat lung allograft recipients: potentiation of immunosuppressive efficacy and improvement of tolerability of staggered versus simultaneous treatment. *Transplantation*, **15**: 956-962, 1999.
37. Kovarik JM, Kalbag J, Figueiredo J, Rouilly M, Frazier OL, Rordorf C. Differential influence of two cyclosporine formulations on everolimus pharmacokinetics: a clinically relevant pharmacokinetic interaction. *J Clin Pharmacol*, **42**: 95-99, 2002.
38. Matsubara T, Kim HJ, Miyata M, Shimada M, Nagata K, Yamazoe Y. Isolation and characterization of a new major intestinal CYP3A form, CYP3A62, in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, **309**: 1282-1290, 2004.
39. Cao X, Gibbs ST, Fang L, Miller HA, Landowski CP, Shin HC, Lennernas H, Zhong Y, Amidon GL, Yu LX, Sun D. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. *Pharm Res*, **23**: 1675-1686, 2006.
40. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, McMichael J, Lever J, Burckart G, Starzl T. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet*, **29**: 404-430, 1995.
41. Ptachcinski RJ, Venkataramanan R, Burckart GJ. Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. *Clin Pharmacokinet*, **11**: 107-132, 1986.
42. Hashimoto Y, Sasa H, Shimomura M, Inui K. Effects of intestinal and hepatic metabolism on the bioavailability of tacrolimus in rats. *Pharm Res*, **15**: 1609-1613, 1998.
43. Igarashi T, Yano I, Saito H, Inui K. Decreased cyclosporin A concentrations in the absorption phase using microemulsion preconcentrate formulation in rats with cisplatin-induced acute renal failure. *Biol Pharm Bull*, **26**: 1591-1595, 2003.
44. Laplanche R, Meno-Tetang GM, Kawai R. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling of everolimus (RAD001) in rats

- involving non-linear tissue uptake. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, **34**: 373-400, 2007.
45. Neumayer HH, Paradis K, Korn A, Jean C, Fritsche L, Budde K, Winkler M, Kliem V, Pichlmayr R, Hauser IA, Burkhardt K, Lison AE, Barndt I, Appel-Dingemanse S. Entry-into-human study with the novel immunosuppressant SDZ RAD in stable renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol*, **48**: 694-703, 1999.
46. Fukudo M, Yano I, Masuda S, Fukatsu S, Katsura T, Ogura Y, Oike F, Takada Y, Tanaka K, Inui K. Pharmacodynamic analysis of tacrolimus and cyclosporine in living-donor liver transplant patients. *Clin Pharmacol Ther*, **78**: 168-181, 2005.
47. Yasuhara M, Hashida T, Toraguchi M, Hashimoto Y, Kimura M, Inui K, Hori R, Inomata Y, Tanaka K, Yamaoka Y. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of FK 506 in pediatric patients receiving living-related donor liver transplantations. *Transplant Proc*, **27**: 1108-1110, 1995.
48. Niwa T, Yamamoto S, Saito M, Shiraga T, Takagi A. Effect of cyclosporine and tacrolimus on cytochrome p450 activities in human liver microsomes. *Yakugaku Zasshi*, **127**: 209-216, 2007.
49. Rao US, Scarborough GA. Direct demonstration of high affinity interactions of immunosuppressant drugs with the drug binding site of the human P-glycoprotein. *Mol Pharmacol*, **45**: 773-776, 1994.
50. Thummel KE, Kunze KL, Shen DD. Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. *Adv Drug Deliv Rev*, **27**: 99-127, 1997.
51. Saad AH, DePestel DD, Carver PL. Factors influencing the magnitude and clinical significance of drug interactions between azole antifungals and select immunosuppressants. *Pharmacotherapy*, **26**: 1730-1744, 2006.
52. Shin JH, Choi KY, Kim YC, Lee MG. Dose-dependent pharmacokinetics of itraconazole after intravenous or oral administration to rats: intestinal first-pass effect. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**: 1756-1762, 2004.

53. Domínguez-Gil Hurlé A, Sánchez Navarro A, García Sánchez MJ. Therapeutic drug monitoring of itraconazole and the relevance of pharmacokinetic interactions. *Clin Microbiol Infect*, **12(suppl 7)**: 97–106, 2006.
54. Kovarik JM, Beyer D, Bizot MN, Jiang Q, Shenouda M, Schmouder RL. Blood concentrations of everolimus are markedly increased by ketoconazole. *J Clin Pharmacol*, **45**: 514-518, 2005.
55. Ogasawara A, Kume T, Kazama E. Effect of oral ketoconazole on intestinal first-pass effect of midazolam and fexofenadine in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos*, **35**: 410-418, 2007.
56. Leather H, Boyette RM, Tian L, Wingard JR. Pharmacokinetic evaluation of the drug interaction between intravenous itraconazole and intravenous tacrolimus or intravenous cyclosporin A in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*, **12**: 325-334, 2006.
57. Mihara A, Mori T, Aisa Y, Yamazaki R, Iketani O, Tanigawara Y, Ikeda Y, Okamoto S. Greater impact of oral fluconazole on drug interaction with intravenous calcineurin inhibitors as compared with intravenous fluconazole. *Eur J Clin Pharmacol*, **64**: 89-91, 2008.
58. Sedrani R, Cottens S, Kallen J, Schuler W. Chemical modification of rapamycin: the discovery of SDZ RAD. *Transplant Proc*, **30**: 2192-2194, 1998.
59. Sedrani R, Cottens S, Kallen J, Schuler W. Chemical modification of rapamycin: the discovery of SDZ RAD. *Transplant Proc*, **30**: 2192-2194, 1998.
60. Aagaard-Tillery KM, Jelinek DF. Inhibition of human B lymphocyte cell cycle progression and differentiation by rapamycin. *Cell Immunol*, **156**: 493-507, 1994.
61. Shinke H, Hashi S, Kinoshita R, Taniguchi R, Sugimoto M, Matsubara K, Ogawa E, Sonoda M, Takada N, Yoshizawa A, Ogawa K, Okamoto S,

- Uemoto S, Masuda S. Effectiveness of sirolimus in combination with cyclosporine against chronic rejection in a pediatric liver transplant patient. *Biol Pharm Bull*, **36**: 1221-1225, 2013.
62. Bierer BE, Mattila PS, Standaert RF, Herzenberg LA, Burakoff SJ, Crabtree G, Schreiber SL. Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**: 9231-9235, 1990.
  63. Kovarik JM, Tedesco H, Pascual J, Civati G, Bizot MN, Geissler J, Schmidli H. Everolimus therapeutic concentration range defined from a prospective trial with reduced-exposure cyclosporine in de novo kidney transplantation. *Ther Drug Monit*, **26**: 499-505, 2004.
  64. Hoyer PF, Ettenger R, Kovarik JM, Webb NJ, Lemire J, Mentser M, Mahan J, Loirat C, Niaudet P, VanDamme-Lombaerts R, Offner G, Wehr S, Moeller V, Mayer H; Everolimus Pediatric Study Group. Everolimus in pediatric de novo renal transplant patients. *Transplantation*, **75**: 2082-2085, 2003.
  65. Van Damme-Lombaerts R, Webb NA, Hoyer PF, Mahan J, Lemire J, Ettenger R, McMahon L, Cambon N, Boger R, Kovarik JM; Everolimus Study Group. Single-dose pharmacokinetics and tolerability of everolimus in stable pediatric renal transplant patients. *Pediatr Transplant*, **6**: 147-152, 2002.
  66. Wallemacq PE, Reding R, Sokal EM, de Ville de Goyet J, Clement de Clety S, Van Leeuw V, De Backer M, Otte JB. Clinical pharmacokinetics of Neoral in pediatric recipients of primary liver transplants. *Transpl Int*, **10**: 466-470, 1997.
  67. Campanero MA, Cardenas E, Sadaba B, Garcia-Quetglas E, Munoz-Juarez MJ, Gil-Aldea I, Pazo D, Azanza JR, Honorato J. Therapeutic drug monitoring for sirolimus in whole blood of organ transplants by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J*

- Chromatogr A*, **1031**: 265-273, 2004.
68. Beal SL, Boeckmann AJ, Sheiner LB. NONMEM Users Guides. NONMEM Project Group. University of California, San Francisco, CA, 1992.
69. van Schaik RH, van der Heiden IP, van den Anker JN, Lindemans J. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clin Chem*, **48**: 1668-1671, 2002.
70. Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res*, **10**: 1093-1095, 1993.



